



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**Proteómica de cuerpos lipídicos en la  
senescencia y la infección por *Pseudomonas  
syringae* en *Arabidopsis thaliana***

TESIS DOCTORAL

Rubén Fernández Santos

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**Proteómica de cuerpos lipídicos en la senescencia y  
la infección por *Pseudomonas syringae* en  
*Arabidopsis thaliana***

TESIS DOCTORAL

**Rubén Fernández Santos**

Directora

**Carmen Castresana Fernández**

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2018

**Proteómica de cuerpos lipídicos en la senescencia y  
la infección por *Pseudomonas syringae* en  
*Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada para optar al grado de  
Doctor en Ciencias, por

**Rubén Fernández Santos**

Universidad Autónoma de Madrid,  
2018

Vº Bº de la Directora de Tesis:

**Dra. Carmen Castresana Fernández**

El Doctorando

**Rubén Fernández Santos**

## Reconocimientos

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Su realización ha sido posible gracias a la Ayuda para Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores BES 2013-064725 dentro del proyecto BIO2012-33954.

Es necesario reconocer a todas las personas que de un modo u otro han contribuido a la obtención de los resultados aquí presentados:

A la Dra. Carmen Castresana por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, así como su por su dirección y guía a lo largo de estos años.

A Tomás Cascón, por su excelente apoyo técnico prestado a lo largo de estos años.

A todos los miembros del laboratorio 315 por su apoyo y colaboración.

A Marta Martínez por su contribución en las construcciones 35S::CLO3:GFP, 35S:: $\alpha$ -DOX1:GFP y 35S::LOX1:GFP.

A Luis Muñiz por su contribución en la construcción 35S::PAD3:GFP

Al Dr. Jurriaan Ton de la Universidad de Sheffield, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio.

Al personal del Servicio de Microscopía del CNB, Sylvia Gutierrez, Ana Oña y Susana Hernández por su inestimable ayuda en todo lo relacionado con la microscopía confocal.

Al servicio de Proteómica del CNB, por los análisis proteómicos de las fracciones de cuerpos lipídicos. A Alberto Paradela, por su apoyo técnico y la resolución de cualquier duda surgida de este proceso.

Al personal del servicio de Citometría de Flujo, M.<sup>a</sup> del Carmen Moreno y Sara Escudero por los análisis mediante esta técnica de las fracciones de cuerpos lipídicos y su dedicación y profesionalidad.

Al servicio de Cultivo *in vitro*, María Luisa Peinado y Beatriz Casal por su ayuda en la preparación de medios y siembra de semillas.

Al servicio de Invernadero, por su colaboración en el mantenimiento de plantas.

A los servicios de Mantenimiento e Instrumentación, por la pronta resolución de los problemas técnicos.

A los departamentos de Personal y Administración, por su profesionalidad y ayuda en todos los trámites realizados.



# Agradecimientos

Quisiera también expresar mi agradecimiento a aquellas personas que han contribuido a que esta tesis viera la luz, y que han hecho más fácil recorrer todo este largo camino.

A Carmen por su tenacidad y constancia a lo largo de estos años.

A Tomás, por su buen humor en el día a día, incluso cuando los experimentos no dan los resultados esperados.

A todos mis compañeros del laboratorio en estos años, pasados y presentes: Ada, Yovanny, Ruth, Verónica, Marta, Ana, Luis, Bran, Pablo y Alfonso, por estar siempre dispuestos a ayudar y ser unos magníficos colegas de investigación.

A Ana y David, especialmente, pero también a todos los demás compañeros de la Universidad de Sheffield, que hicieron que mi estancia en la ciudad del acero fuera una experiencia inolvidable.

A toda la gente del departamento GMP por ayudarme amablemente siempre que lo he necesitado.

## Abreviaturas

**2-HOT:** ácido 2-hidroxiinolénico

**2-HPOT:** ácido 2-hidroperoxinolénico

**avr:** avirulencia

**CLO:** caleosina

**ER:** Retículo endoplásmico

**ETI:** *Effector-triggered immunity*

**GFP:** proteína verde fluorescente

**hpi:** horas post-inoculación

**HR:** respuesta hipersensible

**JA:** ácido jasmónico

**KB:** Medio King's B

**LB:** Medio Luria-Bertani

**LDAP:** *Lipid Droplet Associated Protein*

**LDIP:** *LDAP Interacting Protein*

**LDs:** cuerpos lipídicos

**LOX:** lipoxigenasa

**MAMP:** *Microbial-associated molecular patterns*

**MS:** Medio Murashige-Skoog

**NB-LRR:** *Nucleotide-binding site leucine-rich repeat*

**PAMP:** *Pathogen-associated molecular patterns*

**PRR:** *Pattern recognition receptor*

**Pss:** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

**Pst:** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados.

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SA:** ácido salicílico.

**SAR:** Resistencia sistémica adquirida

**SE:** ésteres de estero

**SRRP:** *Small Rubber Particle Protein*

**TAG:** triacilglicéridos

**ufc:** unidad formadora de colonias

**$\alpha$ -DOX:**  $\alpha$ -dioxigenasa.

# Índice

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen/Abstract.....</b>                                  | <b>1</b>  |
| Resumen.....  | 3         |
| Abstract.....   | 5         |
| <b>Introducción.....</b>                                      | <b>7</b>  |
| Introducción a la defensa de plantas.....                     | 9         |
| Interacción planta-patógeno.....                              | 9         |
| La respuesta de defensa vegetal.....                          | 10        |
| Fitohormonas en la defensa vegetal.....                       | 12        |
| Oxilipinas.....   | 14        |
| Síntesis.....   | 14        |
| Funciones de las oxilipinas.....                              | 17        |
| Introducción a los cuerpos lipídicos.....                     | 18        |
| Definición.....   | 18        |
| El citosol de la célula como emulsión.....                    | 19        |
| Biogénesis de los cuerpos lipídicos.....                      | 20        |
| Cuerpos lipídicos en semillas.....                            | 22        |
| Metabolismo de semillas y cuerpos lipídicos.....              | 22        |
| Cuerpos lipídicos en tejidos reproductivos y vegetativos..... | 24        |
| Proteínas asociadas a cuerpos lipídicos.....                  | 26        |
| <b>Objetivos.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>Material y métodos.....</b>                                | <b>37</b> |
| Material biológico, crecimiento y mantenimiento.....          | 39        |
| Escherichia coli.....   | 39        |
| Especies bacterianas fitopatógenas.....                       | 39        |
| Medios de cultivo de bacterias y condiciones de cultivo.....  | 39        |
| Mantenimiento de las cepas bacterianas.....                   | 39        |
| Manipulación de microorganismos.....                          | 40        |
| Vectores de clonación y transformación.....                   | 40        |
| Crecimiento de plantas en tierra.....                         | 41        |
| Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....           | 41        |
| Tratamientos fitopatógenos.....                               | 42        |
| Aislamiento y análisis de LDs.....                            | 42        |
| Aislamiento de cuerpos lipídicos.....                         | 42        |
| Tinción de cuerpos lipídicos.....                             | 43        |
| Análisis mediante citometría de flujo.....                    | 43        |
| Análisis proteómico.....                                      | 44        |
| Análisis LC-ESI-MSMS y búsqueda en bases de datos.....        | 44        |
| Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....   | 44        |
| Microscopía confocal.....                                     | 45        |
| Extracción de proteínas y SDS-PAGE.....                       | 45        |
| Western Blot.....   | 46        |
| Técnicas de ácidos nucleicos.....                             | 46        |
| Preparación y aislamiento de plásmidos.....                   | 46        |

|   |            |
|---|------------|
| Extracción de RNA de tejido vegetal.....  | 46         |
| Preparación de DNA complementario.....  | 47         |
| Amplificación de fragmentos de DNA.....   | 47         |
| Electroforesis de DNA.....  | 47         |
| Secuenciación de DNA.....   | 47         |
| Sistema Gateway de clonación.....   | 47         |
| Aplicaciones bioinformáticas.....   | 48         |
| <b>Resultados.....</b>  | <b>51</b>  |
| Los LDs se inducen durante la senescencia y la respuesta de <i>Arabidopsis</i> a la<br>infección con <i>Pst</i> DC3000 <i>avrRpm1</i> .....               | 53         |
| Las proteínas $\alpha$ -DOX1 y CLO3 de <i>Arabidopsis</i> se localizan en los cuerpos lipídicos<br>que se forman en las hojas de plantas senescentes..... | 55         |
| Aislamiento de LDs de hojas senescentes mediante gradientes de densidad.....  | 57         |
| Preparación de LDs de hojas senescentes y hojas infectadas de plantas silvestres y<br>validación del protocolo de purificación.....                       | 59         |
| Análisis proteómico de los LDs preparados.....  | 62         |
| Análisis de los proteomas determinados.....   | 64         |
| Comparación con otros proteomas.....  | 67         |
| Análisis de proteínas identificadas.....  | 69         |
| Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....   | 72         |
| Análisis de dominios transmembrana <i>in silico</i> .....   | 74         |
| <b>Discusión.....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>Conclusiones.....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>Bibliografía.....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>Anexo.....</b>   | <b>117</b> |

# Índice de figuras y tablas

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Principios de inmunidad vegetal.....   | 11  |
| <b>Figura 2.</b> Síntesis enzimática de 2-HPOT y sus transformaciones posteriores.....  | 16  |
| <b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la estructura básica de un cuerpos lipídico.....   | 19  |
| <b>Figura 4.</b> Biogénesis de cuerpos lipídicos a partir de la membrana del ER.....  | 21  |
| <b>Figura 5.</b> Metabolismo de los TAG almacenados en los LDs de semillas durante la germinación.....  | 23  |
| <b>Figura 6.</b> Acumulación de LDs en hojas de <i>Arabidopsis</i> .....  | 54  |
| <b>Figura 7.</b> Acumulación de LDs durante la respuesta a la infección de la bacteria <i>Pst</i> DC3000 <i>avrRpm1</i> .....                       | 55  |
| <b>Figura 8.</b> Localización subcelular de las proteínas $\alpha$ -DOX1, CLO3 y LOX1.....  | 56  |
| <b>Figura 9.</b> Procedimiento de obtención de LDs a partir de hojas de plantas transgénicas.....   | 59  |
| <b>Figura 10.</b> Análisis mediante citometría de flujo de fracciones de LDs.....   | 61  |
| <b>Figura 11.</b> Análisis proteómico de fracciones de LDs.....   | 63  |
| <b>Figura 12.</b> Proteínas comunes en los cuerpos lipídicos obtenidos en las diferentes condiciones analizadas.....                                | 66  |
| <b>Figura 13.</b> Localización de proteínas de fusión fluorescentes en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                                  | 73  |
| <b>Figura 14.</b> Análisis <i>in silico</i> de los dominios transmembrana presentes en las proteínas de los LDs.....                                | 76  |
| <b>Figura 15.</b> Modelo de transporte de monómeros de cutina.....  | 89  |
| <b>Figura 16.</b> Modelo de ALDH3F1.....  | 91  |
| <br>  |     |
| <b>Tabla I.</b> Oligonucleótidos empleados para el clonaje de los genes examinados.....   | 48  |
| <b>Tabla II.</b> Proceso de filtrado para la obtención de los proteomas definitivas.....  | 64  |
| <b>Tabla III.</b> Análisis de los diferentes proteomas de LDs obtenidos para términos de Ontología Génica relacionados con Procesos Biológicas..... | 65  |
| <b>Tabla IV.</b> Comparación de los proteomas de LDs con otros proteomas publicados.....  | 68  |
| <br>  |     |
| <b>Tabla S1.</b> Proteoma de LDs de hojas senescentes.....  | 119 |
| <b>Tabla S2.</b> Proteoma de LDs de hojas infectadas con <i>Pseudomonas</i> 24 hpi.....   | 122 |
| <b>Tabla S3.</b> Proteoma de LDs de hojas infectadas con <i>Pseudomonas</i> 72 hpi.....   | 125 |
| <b>Tabla S4.</b> Proteínas comunes a los 3 proteomas.....   | 129 |
| <b>Tabla S5.</b> Proteínas exclusivas de LDs de hojas senescentes.....  | 131 |
| <b>Tabla S6.</b> Proteínas exclusivas de LDs de hojas infectadas con <i>Pseudomonas</i> .....   | 132 |

# Resumen/Abstract



---

## Resumen

En este trabajo hemos observado la formación de cuerpos lipídicos en hojas de *Arabidopsis* durante la respuesta de la planta a la infección con la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* DC3000 *avrRpm1* y durante la senescencia de la planta. Para analizar su composición hemos puesto a punto un método de purificación que permite obtener fracciones enriquecidas en LDs mediante centrifugación en gradientes de densidad. Las fracciones de LDs obtenidas han sido examinadas mediante espectrometría de masas y los proteomas correspondientes han sido determinados. Estos análisis han puesto de manifiesto la presencia de 70 proteínas en los proteomas de LDs obtenidos de tejidos senescentes y de 72 y 81 proteínas en los proteomas de LDs procedentes de hojas infectadas con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1* durante 24 y 72 horas, respectivamente. El análisis de los proteomas caracterizados mostró un enriquecimiento en proteínas que participan en la respuesta de la planta a estímulos bióticos y abióticos, a estrés y en el transporte entre orgánulos o estructuras celulares, lo que sugiere la participación de los LDs en este tipo de procesos. La validez de los datos proteómicos se examinó mediante expresión transitoria de proteínas de fusión con GFP en hojas de *Nicotiana benthamiana* durante la defensa activada por la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Estos ensayos permitieron confirmar la localización de las enzimas GPAT4, GPAT8, ALDH3F1,  $\alpha$ -DOX1 y CLO3 en LDs, mientras que la proteína PAD3:GFP se localiza en la membrana y en el ER en forma de vesículas. La presencia de proteínas de tipo GPAT sugiere la participación de los LDs en procesos relacionados con la modificación y/o síntesis de la cutina. Por otro lado, la presencia de ALDH3F1,  $\alpha$ -DOX1 y CLO3 apoya la participación de los LDs en la síntesis de oxilipinas. Las proteínas identificadas ponen de manifiesto la presencia en los LDs de nuevos componentes proteicos, no identificados hasta el momento, y permiten proponer nuevas funciones y procesos en los que los LDs formados en los tejidos vegetativos de la planta podrían participar.

---

## Abstract

Here, we studied the accumulation of lipid droplets in leaves of *Arabidopsis* during the plant response to *Pst* DC3000 *avrRpm1* infection and during senescence. In order to increase our knowledge about lipid droplet protein content we established a procedure to isolate highly pure lipid droplets fractions from vegetative tissues by density gradient centrifugation. We used *shotgun* proteomics to define the proteome of the lipid droplets. In these studies we found that the LDs proteome of senescent leaves contain 70 proteins, whereas the LD proteome from *Pst* DC3000 *avrRpm1* infected leaves at 24 h and 72 h post-infection contained 72 and 81 proteins, respectively. The analyses of the proteomes characterized revealed an enrichment in proteins involved in response in GO terms related to abiotic or biotic stimulus, stress and transport, suggesting the role of lipid droplets in these biological processes. In order to validate our proteomic results, we used transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves to confirm the localization in lipid droplets of a few candidates proteins. Thus, enzymes like GPAT4, GPAT8, ALDH3F1,  $\alpha$ -DOX1 and CLO3 were localized in lipid droplets. The presence of GPAT proteins in lipid droplets suggests a role of lipid droplets in cutin assembly, a key component of plant cuticle, whereas the presence of ALDH3F1,  $\alpha$ -DOX1 and CLO3 support the participation of these organelles in the synthesis of oxylipins. Together, these results reveal new lipid droplets-associated proteins that could extend the functions of vegetative lipid droplets.

# Introducción

## **Introducción**

### **Introducción a la defensa de plantas**

Tanto en su medio natural como en las condiciones de cultivo agrícola, las plantas están expuestas a estreses ambientales, que generalmente afectan negativamente al crecimiento, al desarrollo y a la productividad. Este tipo de estreses puede dividirse en abióticos, si está ocasionado por un exceso o déficit en el ambiente físico o químico, como pueden ser la sequía, las temperaturas extremas, salinidad, luz insuficiente, etc., o bióticos, si es debido a otros organismos (Buchanan et al., 2017). Por ello, las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución diversas estrategias de adaptación que les permite hacer frente a este tipo de estreses.

### **Interacción planta-patógeno**

Las plantas deben defenderse continuamente del ataque de patógenos, tales como bacterias, virus, oomicetos e invertebrados. Para ello disponen de una serie de mecanismos de defensa que les permiten responder de una forma adecuada frente a estos agentes patógenos. Parte de los mecanismos defensivos están presentes en la planta de manera constitutiva actuando como barreras físicas y químicas preformadas que dificultan la entrada del patógeno, y conforman una primera línea de defensa. Por el contrario, las defensas inducidas se activan cuando el patógeno ha logrado penetrar al interior de la planta, bien a través de aberturas naturales, heridas, o empleando mecanismos activos de penetración, e implican la participación de rutas específicas de señalización (Pieterse et al., 2009).

El ataque de las plantas por organismos patógenos permite establecer dos tipos de interacciones denominadas compatibles e incompatibles (Hammond-Kosack y Parker, 2003). En las interacciones incompatibles, el patógeno es capaz de establecer una infección inicial en el área de entrada, pero no consigue progresar e invadir otros tejidos, con lo que la planta es resistente a dicho patógeno, y éste recibe el nombre de avirulento. Por el contrario, en las interacciones compatibles el patógeno es capaz de progresar desde el punto de infección inicial y se extiende sistémicamente por el resto de la planta. En este caso se dice que la planta es susceptible y el patógeno virulento. Por otro lado, los patógenos pueden dividirse en dos grandes grupos en función de la estrategia

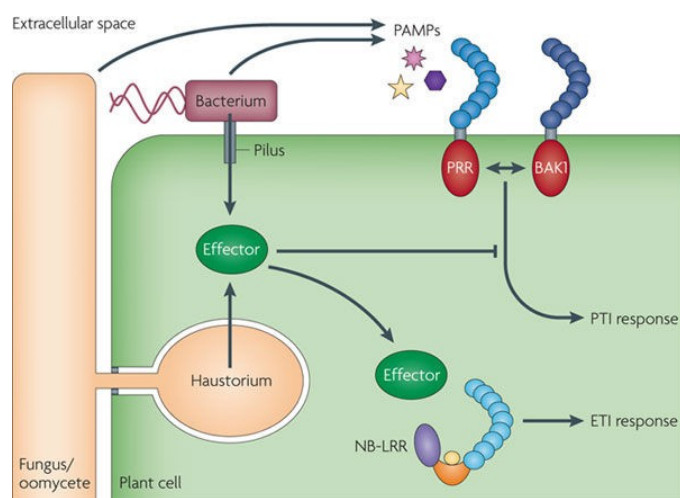
empleada durante la infección: biotrofos y necrotrofos. Los patógenos biotrofos obtienen nutrientes a partir de tejidos vegetativos vivos, por lo que la infección no conlleva la muerte de las zonas afectadas, mientras que los patógenos necrotrofos obtienen sus nutrientes a partir de tejidos vegetales muertos o senescentes. En este último caso la infección sí conlleva la muerte de la zona infectada. No obstante existen patógenos cuya estrategia no se ajusta de forma estricta a ninguno de estos dos casos, sino que las estrategias de infección varían en las distintas etapas de su ciclo vital o dependiendo de las condiciones del medio, en cuyo caso reciben el nombre de hemibiotrofos (Glazebrook, 2005).

## La respuesta de defensa vegetal

### Mecanismos de reconocimiento del patógeno

Todos aquellos mecanismos de defensa que se activan en la planta en respuesta a la presencia de patógenos se conocen como defensa o inmunidad vegetal. Dichos mecanismos actúan en dos niveles que se inducen de forma consecutiva de acuerdo al progreso de la infección. En el primer nivel se encuadran las estrategias defensivas mediadas por un conjunto de receptores situados en la membrana plasmática conocidos como PRRs (del inglés *Pattern-Recognition Receptors*). Estos receptores son capaces de reconocer patrones moleculares conservados asociados a microorganismos patógenos, denominados MAMPs (del inglés *Microbe-Associated Molecular Pattern*) o PAMPs (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) (Zipfel y Felix, 2005; Mackey y McFall, 2006; Zipfel, 2008). El reconocimiento de PAMPs por parte de los PRRs desencadena cascadas de señalización en la planta encaminadas a restringir la entrada y proliferación del patógeno, que se denominan en su conjunto PTI (del inglés *PAMP-Triggered Immunity*) (Nürnberger y Lipka, 2005; Ham et al., 2007) (Figura 1). En algunas ocasiones esta respuesta puede ser suficiente para evitar la enfermedad en la planta (Zipfel et al., 2004; Jones y Dangl, 2006).

En el segundo nivel encontramos la denominada resistencia inducida por efectores, más eficaz e intensa. Las proteínas R o de resistencia (también conocidas como NB-LRR) (Jones y Dangl, 2006) son capaces de reconocer efectores microbianos (factores de avirulencia) liberados por los patógenos durante la infección. Este proceso de reconocimiento, que ocurre en el citosol de la célula, desemboca en una respuesta similar a la PTI, pero más intensa y de mayor amplitud, denominada resistencia inducida por



Nature Reviews | Genetics

**Figura 1. Principios de la inmunidad vegetal.** Las moléculas liberadas por los patógenos al espacio extracelular, denominadas PAMPs, son reconocidas por los receptores PRR, que activan a su vez una primera respuesta de defensa conocida como PTI. Además, los organismos patógenos disponen a menudo de mecanismos que contrarrestan esta respuesta por medio de efectores que tras su liberación al interior de la célula vegetal, suprimen la respuesta PTI. Las plantas a su vez han desarrollado un segundo nivel de defensa, en el que los efectores producidos por los patógenos son reconocidos por receptores intracelulares, conocidos como proteínas NB-LRR, que inducen una respuesta de defensa más intensa denominada ETI. Tomado de Doods y Rathjen, 2010.

efector o ETI (del inglés *Effector-triggered immunity*) (Jones y Dangl, 2006; Zipfel, 2008) (Figura 1). Con frecuencia la ETI conlleva la activación de la respuesta hipersensible o HR (Chisholm et al., 2006; Jones y Dangl, 2006) destinada a controlar la propagación del patógeno hacia otros tejidos mediante la inducción de un proceso de muerte celular programada en los puntos de infección.

### Respuestas celulares en la defensa vegetal

El reconocimiento del patógeno por parte de la planta, bien por medio de los receptores PRRs o por medio de proteínas R, desencadena una serie de eventos en el interior de la célula vegetal. Aunque la percepción del patógeno depende de mecanismos complejos que pueden llegar a ser altamente específicos, los cambios que tienen lugar tras dicho reconocimiento son similares. No obstante, se han descrito diferencias en los primeros pasos de la señalización, así como en la intensidad y el tiempo de inducción de ambas respuestas (Jones y Dangl, 2006; Tsuda y Katagiri, 2010). Uno de los primeros

eventos que se producen tras el reconocimiento del patógeno es la alteración en el flujo de iones a través de la membrana plasmática, que ocasiona la entrada de  $H^+$  y  $Ca^{2+}$  en la célula y la salida de  $K^+$  y aniones al espacio extracelular (Nürnberg y Lipka, 2005). Esto provoca la despolarización de la membrana que tiene como consecuencia la producción de un estallido oxidativo, encaminado a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de óxido nítrico (RNS) (Lamb y Dixon, 1997; Apel y Hirt, 2004; Laloi et al., 2004; Averyanov, 2009). La generación de estos compuestos tiene lugar en distintos orgánulos y compartimentos celulares, como mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas o el espacio extracelular. Las especies reactivas de oxígeno ejercen distintas acciones en relación a la defensa vegetal. Dada su alta reactividad, poseen actividad antimicrobiana directa (Fang, 2004; Shetty et al., 2008) y su acumulación puede ocasionar daños celulares, entre los que se incluyen la peroxidación de lípidos de membrana, la alteración de proteínas y daños en el DNA, que contribuyen al envejecimiento celular, llegando incluso a provocar la muerte del tejido (Doke et al., 1996; Foyer y Noctor, 2005; Asai et al., 2008). Además participan en otros procesos de defensa de la planta, como la formación de lignina y calosa (O'Brien et al., 2012) y la activación de la respuesta sistémica (Miller et al., 2009; Dubiella et al., 2013).

La inducción de PTI está con frecuencia acompañada de la activación de MAP quinasas, que conducen a la modificación de proteínas como algunos factores de transcripción, componentes del citoesqueleto y otras quinasas, además de formar parte de la resistencia basal (Meng y Zhang, 2013). En respuesta a la infección también se producen diversas clases de proteínas y metabolitos con actividad antimicrobiana, entre los que encontramos enzimas que degradan la pared celular de hongos, proteínas que alteran la permeabilidad de la membrana plasmática o proteasas que actuarían sobre las proteínas del patógeno (Ferreira et al., 2007).

### Fitohormonas en la defensa vegetal

La activación de la respuesta de defensa vegetal conlleva la inducción coordinada de numerosos procesos como los anteriormente mencionados. Todo ello se encuentra regulado por la acción de moléculas señalizadoras, entre las que destacan las fitohormonas ácido salicílico (SA), jasmonatos (JA) y etileno (ET) (Thomma et al., 2001; Pieterse et al., 2009). Estas fitohormonas son capaces de controlar la respuesta de defensa de la planta mediante la regulación de los genes necesarios para hacer frente a cada tipo de patógeno. De manera general, la ruta de señalización regulada por SA está

asociada con la resistencia frente a patógenos de tipo biotrofo y hemibiotrofo, mientras que la combinación de las rutas de señalización reguladas por JA y ET activan la resistencia frente a patógenos necrotrofos (Glazebrook, 2005). Estas dos rutas son en su mayor parte antagónicas.

El SA participa en la activación de la resistencia inducida, el establecimiento de la respuesta hipersensible (Alvarez, 2000), la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Fu y Dong, 2013) y la limitación del crecimiento de patógenos (Vlot et al., 2009), lo que da idea de la importancia que esta fitohormona posee en la resistencia vegetal. La actividad principal del SA se realiza a través del activador transcripcional NPR1 (Mou et al., 2003; Rochon et al., 2006) que en presencia de SA da lugar a su forma monomérica activa que es capaz de entrar al núcleo, favoreciendo la unión de factores de transcripción a los elementos reguladores de los promotores de los genes de respuesta a SA.

El JA también regula un importante número de genes de defensa. Su síntesis comienza en los cloroplastos, donde se produce la oxidación del ácido linolénico (18:3) por la acción de 13-lipoxigenasas (Bannenberg et al., 2009a). La respuesta a JA se activa como consecuencia de su interacción con la proteína COI1, perteneciente al complejo de ubiquitinación SCF<sup>COI1</sup> (Browse, 2009; Sheard et al., 2010), que ocasiona la degradación de los represores constitutivos JAZ y la liberación de factores de transcripción (MYC2, ORA59 o ERF1), que actúan en la inducción de la expresión de genes de defensa (Chini et al., 2009; Fonseca et al., 2009).

Finalmente, el ET regula otra parte importante de la activación de la respuesta de defensa vegetal y la ruta de señalización ha sido bien caracterizada. La percepción de etileno se realiza por medio de receptores como ETR1, que se localizan en la membrana del retículo endoplásmico (Kendrick y Chang, 2008), y que actúan como reguladores negativos de la ruta (Hua y Meyerowitz, 1998). Cuando el etileno se une al receptor, éste se inhibe, lo que activa los reguladores positivos que provocan la síntesis de factores de transcripción específicos de la respuesta a esta fitohormona, que contribuye a la inducción de la expresión de genes de defensa como *PDF1.2*. Esta ruta actúa de forma coordinada y sinérgica con la regulada por la acción del JA (Onkokesung et al., 2010).



## Oxilipinas

Los lípidos son compuestos esenciales en todos los organismos vivos debido a la amplia variedad de funciones que llevan a cabo. Así, pueden realizar un papel estructural, ser una fuente importante de energía o actuar como señales celulares contribuyendo a la regulación de procesos relacionados con el desarrollo o la adaptación a distintas condiciones de estrés (Buchanan et al., 2017)

Las oxilipinas constituyen una familia de derivados lipídicos con estructuras y actividades biológicas diversas, que son sintetizados a partir de distintos ácidos grasos (Mosblech et al., 2009). Estos compuestos representan el equivalente en plantas de los eicosanoides de mamíferos, que se sintetizan a partir del ácido araquidónico, de 20 átomos de carbono, y participan como señales en la regulación de procesos del desarrollo y de la respuesta inmune en vertebrados (Yaqoob, 2003; Wymann y Schneider, 2008). En plantas, las oxilipinas participan en la regulación de la respuesta de defensa frente a microorganismos patógenos, en procesos de reproducción y en desarrollo vegetal (López et al., 2008; Bannenberg et al., 2009a; Kachroo y Kachroo, 2009). Al tratarse de moléculas más polares que los ácidos grasos de los que proceden, las oxilipinas son especialmente adecuadas para el establecimiento de la comunicación entre los procesos oxidativos de las membranas y el interior celular, y en general actuando como moléculas señalizadoras (Eckardt, 2008).

### Síntesis

En plantas, la biosíntesis de oxilipinas se inicia mediante la incorporación de oxígeno en las moléculas de ácidos grasos, principalmente insaturados como el ácido linoléico (18:2) y linolénico (18:3). Este proceso tiene lugar preferentemente mediante oxidación enzimática catalizada por dos tipos de oxigenasas, las lipoxigenasas (LOXes) y las  $\alpha$ -dioxigenasas (Blée, 1998; Hamberg et al., 1999). No obstante, la síntesis de oxilipinas también tiene lugar mediante oxidación química no enzimática, como resultado de la interacción de los ácidos grasos con radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Savchenko et al., 2014). Como consecuencia de estas reacciones se generan derivados hidroperóxidos inestables que constituyen los productos primarios de la reacción de oxidación.

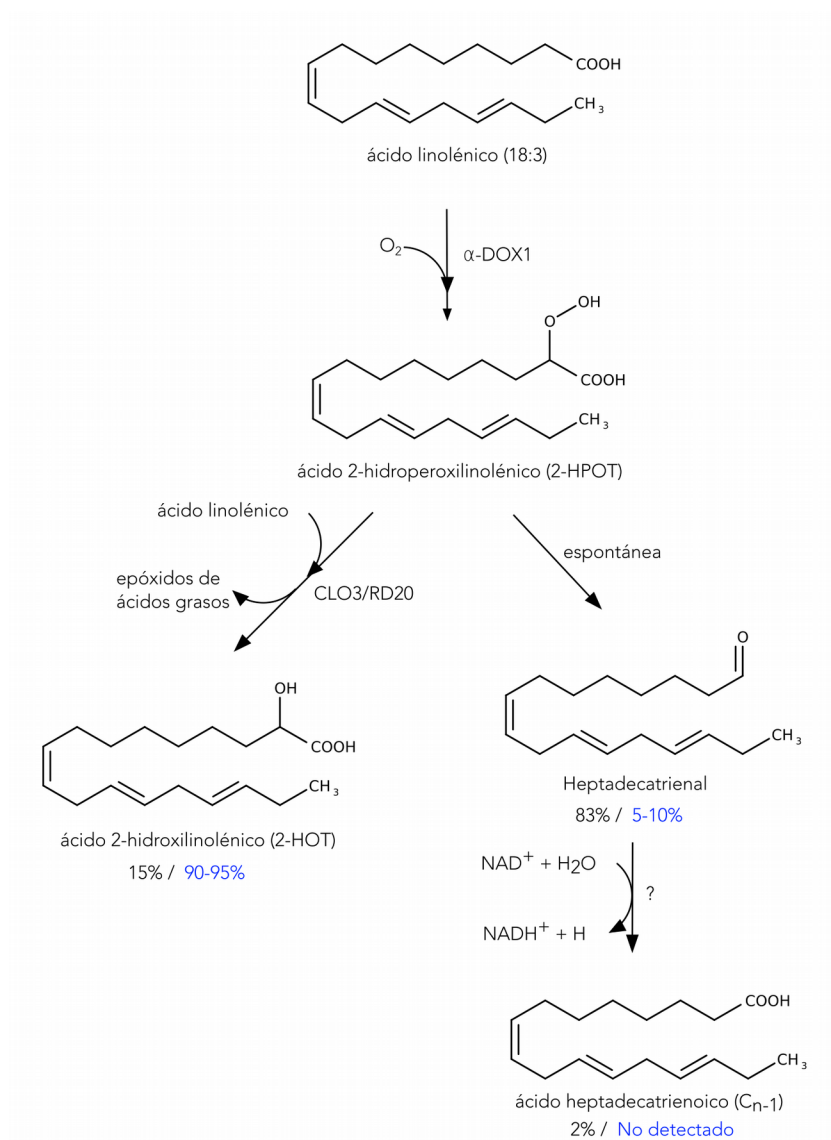
### $\alpha$ -dioxigenasas

Son un tipo de oxigenasas que transfieren al sustrato ambos átomos de la molécula de O<sub>2</sub>. Esta transferencia la realizan sobre el carbono  $\alpha$  de los ácidos grasos sobre el que actúan, situado en posición adyacente al carbono que porta el grupo funcional carboxílico, generando los correspondientes derivados 2-hidroperóxidos (Figura 2).

Esta actividad enzimática fue detectada inicialmente en plantas de tabaco y el enzima fue caracterizado como una oxigenasa de ácidos grasos inducible por patógenos, recibiendo el nombre de PIOX (del inglés *Pathogen-induced Oxygenase*) (Sanz et al., 1998). Se han descrito  $\alpha$ -dioxigenasas en diversas especies de plantas, incluyendo *Arabidopsis* y tomate (Hamberg et al., 2005; Bannenberg et al., 2009b). A diferencia de las lipoxigenasas, las enzimas  $\alpha$ -dioxigenasas pueden emplear como sustrato ácidos grasos con diferentes niveles de saturación, entre los que se incluyen ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3), así como ácidos grasos poliinsaturados (Blée, 1998; Prost et al., 2005; Bannenberg et al., 2009b). Independientemente del ácido graso empleado como sustrato, el producto primario de la oxigenación es un derivado 2-hidroperóxido. En ensayos *in vitro* se pudo determinar que los 2-hidroperóxidos derivados de la actividad  $\alpha$ -dioxigenasa se convierten de forma espontánea en tres tipos de compuestos: un hidroxiácido del mismo número de carbonos, y los correspondientes aldehídos y ácidos grasos con un carbono menos que el ácido graso utilizado como sustrato (Figura 2) (Hamberg et al., 1999). De los tres tipos de productos generados (hidroxiácidos, aldehídos n-1 y ácidos n-1) los aldehídos y los ácidos grasos se acumulan en mayor proporción, alcanzando el 90% del total de los productos sintetizados (Figura 2) (Hamberg et al., 1999). No obstante, el análisis de la actividad dioxigenasa *in planta*, tras la infección de bacterias patógenas, ha puesto de manifiesto que la reducción de los hidroperóxidos está favorecida frente a la descarboxilación, de manera que los hidróxidos alcanzan el 85% del total de los productos acumulados (Figura 2) (Hamberg et al., 2003). Estos resultados indicaban la presencia de una actividad enzimática adicional en la planta responsable de la reducción de los hidroperóxidos a hidróxidos (Hamberg et al., 2003; Hanano et al., 2006), actividad que puede ser catalizada la peroxigenasa CLO3/RD20 (Shimada et al., 2014).

Las enzimas  $\alpha$ -dioxigenasas participan en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos biotrofos, regulando, entre otros procesos, el daño celular asociado a la activación de la respuesta hipersensible y la activación de la respuesta sistémica

(Steppuhn et al., 2010; Vicente et al., 2012). Por otra lado, estas enzimas participan también en la regulación de procesos del desarrollo vegetal (Bannenberg et al., 2009b).



**Figura 2. Síntesis enzimática de 2-HPOT y sus transformaciones posteriores.** La acción del enzima  $\alpha$ -DOX1 sobre el ácido linolénico da lugar a la formación del correspondiente hidroperóxido (2-HPOT), que al ser inestable, puede descarboxilarse de forma espontánea dando lugar a la formación de heptadecatrienal que puede posteriormente transformarse en el correspondiente ácido carboxílico de un carbono menos por la acción de una aldehído deshidrogenasa. El 2-hidroperoxilínolénico puede además se reduce a 2-HOT tanto de forma espontánea como de forma enzimática por la acción del enzima CLO3. Esta última conversión se ve favorecida en las plantas tras la infección de patógenos en donde el derivado 2-HOT alcanza altos niveles de acumulación. Los porcentajes indican la proporción en la que se han encontrado los derivados de 2-HPOT *in vitro* (negro) e *in vivo* (azul).

En *Arabidopsis* se ha identificado la presencia de dos genes  $\alpha$ -DOX, denominados  $\alpha$ -DOX1 y  $\alpha$ -DOX2, que muestran un nivel de identidad a nivel de proteína superior al 60% (Hamberg et al., 2005).

### Lipoxigenasas

Las lipoxigenasas constituyen una familia de dioxigenasas que catalizan la incorporación de oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados que contienen al menos un doble enlace conjugado, tales como los ácidos linoleico y linolénico. Al igual que ocurre con las  $\alpha$ -DOX, la reacción catalizada por estas enzimas da lugar a la formación de hidropéroxidos, que posteriormente son modificados por la acción de diferentes actividades enzimáticas. En *Arabidopsis* se han identificado seis proteínas con actividad lipoxigenasa (AtLOX1-AtLOX6) que se dividen en dos grupos dependiendo de la posición del carbono, 9 o 13, en el que ocurre la oxigenación, generando 9-hidropéroxidos o 13-hidropéroxidos. Así, los genes *LOX1* y *LOX5* codifican enzimas con actividad 9-lipoxigenasa, mientras que los genes designados como *LOX2*, *LOX3*, *LOX4* y *LOX6* codifican proteínas con actividad 13-lipoxigenasa (Bannen et al., 2009a).

Además de la reacción de oxigenación, las lipoxigenasas pueden catalizar dos reacciones adicionales tales como la conversión secundaria de hidropéroxidos a hidróxidos (reacción hidroperoxidasa) y la formación de epóxidos (reacción leucotrieno sintasa), aunque en condiciones fisiológicas la reacción principal es la dioxigenación.

### Funciones de las oxilipinas

Los estudios realizados durante las dos últimas décadas han puesto de manifiesto la importancia de las oxilipinas en la regulación de procesos relacionados con el desarrollo y la respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico. Gran parte de los genes que participan en la síntesis de oxilipinas se inducen en respuesta a la infección de las plantas por diferentes patógenos (De León et al., 2002; Farmer et al., 2003)

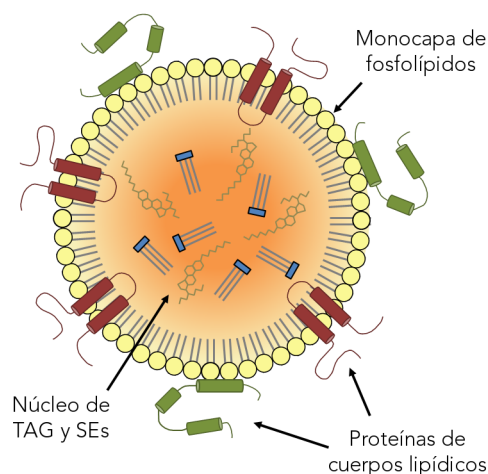
Aunque la función de muchas de las oxilipinas se desconoce, los jasmonatos han sido ampliamente caracterizados, demostrándose su participación en la respuesta de defensa frente a patógenos necrotrofos, a heridas mecánicas, en la protección frente a insectos y en la maduración del polen (Creelman y Mullet, 1997). Otros compuestos sintetizados por la ruta de 13-LOX como el 12-oxoPDA, precursor del JA, actúan como reguladores de genes de defensa, mientras que otros compuestos derivados, como 13-HPOT y 13-HOT, actúan como inductores de la expresión génica y como compuestos

antimicrobianos (Prost et al., 2005). Los compuestos 9-KOD y 9-KOT contribuyen tanto a la inducción de genes de defensa como a la activación de procesos de muerte celular (Montillet et al., 2005; Prost et al., 2005; Kishimoto et al., 2008). Igualmente las oxilipinas 9-KOT y 9-HOT actúan en procesos del desarrollo radicular y en la activación de respuestas defensivas como la inducción de la expresión génica, de las modificaciones de la pared celular y la regulación de la ruta de reparación del daño celular (Vellosillo et al., 2007; Marcos et al., 2015). Otros estudios han demostrado la participación de las rutas iniciadas por la acción de  $\alpha$ -DOX1 en la defensa de la planta frente a la infección por patógenos biotrofos, y su función en el control del daño celular asociado con la generación del estrés oxidativo que acompaña a la inducción de la defensa vegetal frente a este tipo de patógenos, así como en procesos de desarrollo tales como la senescencia de las plantas (De León et al., 2002; Bannenberg et al., 2009b).

## Introducción a los cuerpos lipídicos

### Definición

Los cuerpos lipídicos (en adelante, LDs, del inglés *Lipid Droplets*) son orgánulos esféricos relativamente simples, consistentes en un núcleo o matriz de lípidos neutros, generalmente triacilglicéridos (TAGs) y ésteres de esteroles (SEs), que se encuentran rodeados de una monocapa de fosfolípidos en la que se hallan embebidas diversas proteínas (Murphy, 1993; Chapman et al., 2012) y cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Huang y Huang, 2017) (Figura 3). La primera observación de estos orgánulos corresponde a van Leeuwenhoek, que visualizó glóbulos de grasa en 1674 en un microscopio que él mismo fabricó (Yang et al., 2012a). Estudios posteriores han puesto de manifiesto la presencia de LDs en todos los eucariotas: levaduras (Leber et al., 1994), mamíferos (Murphy, 2001; Hodges y Wu, 2010), *Caenorhabditis elegans* (Mak, 2012; Zhang et al., 2012), *Drosophila melanogaster* (Beller et al., 2006; Beller et al., 2010) y plantas (Hsieh y Huang, 2004), pero también en procariotas (Wältermann et al., 2005). En las plantas, reciben también el nombre de oleosomas, gotas lipídicas o esferosomas (Pyc et al., 2017b). Estos orgánulos constituyen un nodo importante del metabolismo de lípidos de la célula y su estudio se ha intensificado notablemente en las dos últimas décadas a raíz de importantes hallazgos que han situado a este orgánulo como algo más que un actor secundario dentro de la célula (Tirinato et al., 2017).



**Figura 3. Representación esquemática de la estructura básica de un cuerpo lipídico.** Los cuerpos lipídicos son orgánulos esféricos, de entre 0,5 y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, que constan de un núcleo de triacilglicéridos (TAGs) y ésteres de esteroles (SEs), rodeado de una monocapa de fosfolípidos, en la que se encuentran asociadas proteínas, de manera integral o periférica.

### El citosol de la célula como emulsión

La presencia de LDs en el citoplasma de la célula convierten a esta solución acuosa en una emulsión, en la que los lípidos presentes en los LDs conformarían la fase dispersa, mientras que el citosol acuoso representaría la fase continua. Este hecho abre la puerta a que procesos de la biología de los LDs, tales la biogénesis, el crecimiento y la contracción, se rijan por los principios físicos de las emulsiones (Thiam et al., 2013; Thiam y Forêt, 2016; Walther et al., 2017). Uno de estos principios es el de la metaestabilidad, en el que se contempla que las emulsiones metaestables, aunque son termodinámicamente inestables, existen durante un período de tiempo lo suficientemente prolongado como para ser entidades relevantes en un contexto biológico, tras lo cual tienen a coalescer formando una única fase dispersa dirigida a minimizar la tensión superficial (Thiam et al., 2013; Walther et al., 2017). Esta estabilidad parcial se consigue gracias a que la fase dispersa (el núcleo de los LDs) se encuentra rodeada de una monocapa de fosfolípidos (anfifílicos o anfipáticos) surfactantes (Thiam et al., 2013).

En plantas, además de en el citosol, los LD se encuentran también en los plastidios, donde reciben el nombre de plastoglóbulos (Rottet et al., 2015). En los cloroplastos los LDs están principalmente adheridos a las membranas de los tilacoides (Rey et al., 2000;

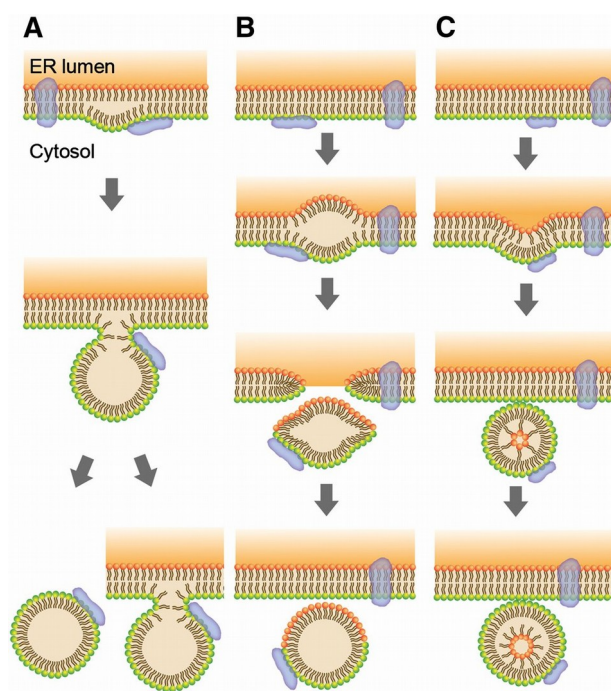
Bréhélin y Nacir, 2013), aunque también se encuentran en cantidades menores en el estroma de estos orgánulos (Ghosh et al., 1994).

### Biogénesis de los cuerpos lipídicos

En eucariotas, los LDs se forman *de novo* a partir del retículo endoplásmico (ER) (Jacquier et al., 2011; Chapman et al., 2012; Kassan et al., 2013; Choudhary et al., 2015), en donde se localizan las enzimas que participan en la síntesis de lípidos neutros (Li-Beisson et al., 2013). Aunque a nivel molecular la biogénesis de LDs está poco caracterizada, la investigación realizada en los últimos años ha demostrado que este proceso requiere la actividad coordinada de un número importante de participantes (Barneda y Christian, 2017; Chen y Goodman, 2017). En el modelo principal (Figura 4A), según el cual los LDs derivan de la hemimembrana citosólica del ER, el proceso suele dividirse en varias etapas: i) síntesis de TAGs dentro del ER; ii) formación de un engrosamiento (lente) en la membrana del ER por acumulación de TAGs entre las dos hemimembranas del ER, que no pueden integrarse en la membrana por carecer de grupos polares; iii) formación del cuerpo lipídico incipiente y liberación al citosol (Wilfling et al., 2014; Walther et al., 2017).

Numerosos estudios sugieren, además, que los LDs se forman en localizaciones discretas o subdominios dentro del ER (Jacquier et al., 2013; Kassan et al., 2013). Esto ha mostrado al ER como un compartimento con regiones o zonas especializadas en determinadas funciones, entre las que se incluyen la biogénesis de los LD (Sparkes et al., 2009; Park y Blackstone, 2010; Lynes y Simmen, 2011). Esta hipótesis se ve avalada por el hecho de que algunas enzimas de la síntesis de TAGs en plantas, como DGAT, o proteínas de los LDs como las oleosinas se localizan en regiones discretas del ER (Sarmiento et al., 1997; Lacey et al., 1999; Shockey et al., 2006). Los mismos resultados han sido observados en levaduras y mamíferos (McFie et al., 2010; Adeyo et al., 2011).

No obstante, se han propuesto modelos alternativos de biogénesis de LDs (Figura 4B y 4C). El modelo bicelar propone que los LDs se liberan a partir del ER, pero tanto la hemimembrana interna (orientada hacia el lumen del ER) como la externa (hacia el citosol) contribuirían a la monocapa característica del cuerpo lipídico (Ploegh, 2007; Guo et al., 2009). En un tercer modelo, denominado de gemación vesicular, los cuerpos lipídicos se forman inicialmente dentro de pequeñas vesículas rodeadas de una bicapa de fosfolípidos, empleando la maquinaria de formación de vesículas de la ruta secretora



**Figura 4. Biogénesis de cuerpos lipídicos a partir de la membrana del ER.** Se muestran de forma esquemática los modelos propuestos. A) modelo lenticular: los lípidos neutros se acumulan entre las dos hemimembranas del ER hasta que se alcanza un nivel crítico. El núcleo lipídico va sobresaliendo hasta la formación de un LD. En este caso, toda la monocapa de fosfolípidos deriva exclusivamente de la hemimembrana externa del ER, orientada hacia el citosol. El LD puede liberarse completamente o quedar adjunto a la membrana del ER, formando un continuo ER-LD. B) modelo bicelar: la formación es similar al modelo lenticular, pero el LD se escinde de la membrana del ER, y las dos hemimembranas contribuyen a formar la monocapa de los LDs finales. C) modelo vesicular: la formación del núcleo del LD necesita un reordenamiento de la hemimembrana interna de la bicapa del ER. Tomado de Kohlwein et al., 2013.

(Walther y Farese, 2009; Kohlwein et al., 2013). La vesícula recién formada incrementaría gradualmente su contenido en lípidos neutros (bien por cercanía al ER o mediante algún tipo de transportador), hasta que la luz vesicular fuera eliminada o constituyese tan solo una ínfima parte del LDs. Cualquier resquicio de esta parte podría bien fusionarse con la monocapa que delimita el LD o bien permanecer dentro de su núcleo como una pequeña inclusión de material acuoso (Guo et al., 2009; Walther y Farese, 2009; Kohlwein et al.,



2013). Es importante mencionar que los diferentes modelos no son mutuamente excluyentes.

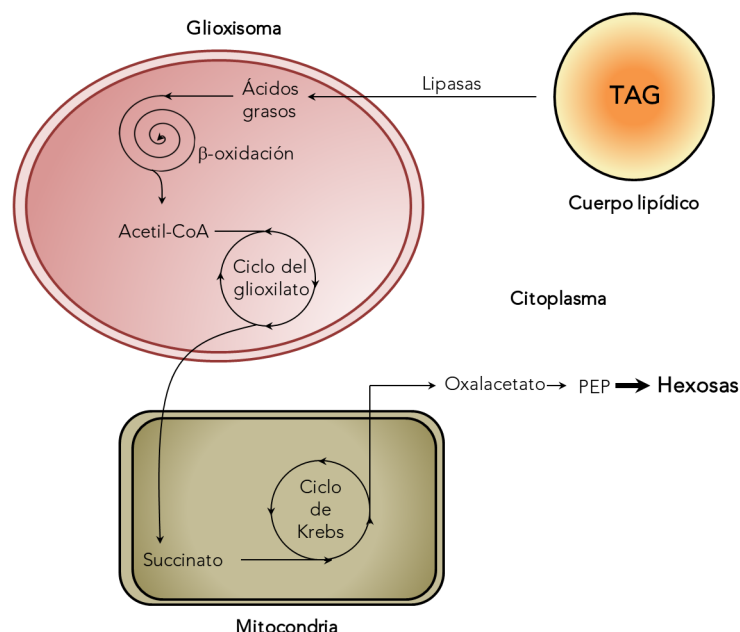
### Cuerpos lipídicos en semillas

Las plantas acumulan LDs tanto en tejidos vegetativos como en tejidos reproductivos (Penfield et al., 2006; Chapman et al., 2012), siendo particularmente abundantes en las semillas (células del embrión y endospermo), en donde actúan como orgánulos de reserva energética, proporcionando una fuente de carbono que es empleada durante la germinación y el establecimiento de la plántula (Siloto et al., 2006; Chapman et al., 2012). Los LDs presentes en las semillas han sido extensamente caracterizados y su función, en relación al metabolismo de semillas, ha sido objeto de numerosos trabajos.

### Metabolismo de semillas y cuerpos lipídicos

Los principales productos de reserva en las semillas de *Arabidopsis* son de naturaleza lipídica y proteica (proteínas SSPs, del inglés *seed storage proteins*) (Baud et al., 2008), mientras que a diferencia de otras especies el almidón está prácticamente ausente (Andriotis Vasiliou M. E. et al., 2010). Las semillas, sobre todo las oleaginosas, acumulan gran cantidad de lípidos neutros, fundamentalmente TAGs, que durante el proceso de maduración (Graham, 2008) se almacenan en los LDs. Este material constituye una fuente de energía que permite el crecimiento y desarrollo de la planta hasta que alcanza su capacidad fotosintética (Huang, 1996; Chapman et al., 2012). Dado que las plantas no son capaces de transportar lípidos desde los cotiledones a los otros tejidos de la plántula durante la germinación, los lípidos almacenados deben convertirse en una fuente de carbono más móvil, que generalmente es la sacarosa. El proceso de movilización de reservas energéticas requiere de la participación de diferentes orgánulos y diversas rutas metabólicas (Graham, 2008).

La conversión de los lípidos almacenados a sacarosa comienza con la hidrólisis de los TAGs para generar ácidos grasos libres (Figura 5). Este proceso está mediado por enzimas con actividad lipasa, tales como SDP1 y SDP1L (del inglés, *Sugar Dependent-1* y *Sugar Dependent-1-Like*, respectivamente) (Huang, 1992; Eastmond, 2006; Kelly et al., 2011) que al actuar sobre los TAGs dan lugar a tres moléculas de ácidos grasos libres y una de glicerol. Durante este proceso, los cuerpos lipídicos y los glioxisomas se encuentran muy próximos entre sí, llegando a establecerse un contacto físico entre ellos



**Figura 5. Metabolismo de los TAGs almacenados en los LDs de semillas durante la germinación.** Las semillas acumulan TAGs en los LDs en su etapa de maduración, y durante la germinación, son movilizados para proporcionar a la planta una fuente de carbono reducido. Para ello, los TAGs son, en primer lugar hidrolizados por acción de lipasas, generando ácidos grasos libres y glicerol. Los ácidos grasos libres entran en el glioxisoma, en donde tiene lugar la  $\beta$ -oxidación, dando lugar a acetil-CoA, que se incorpora al ciclo del glioxilato para dar succinato, el cual es exportado del glioxisoma al citosol e importado a la mitocondria, en donde gracias al ciclo de Krebs es capaz de generar oxalacetato. El oxalacetato puede ser convertido en hexosas mediante la ruta gluconeogénica.

(Hayashi et al., 2001), que podría facilitar el transporte de lípidos desde los LDs hasta los glioxisomas, en donde tiene lugar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la formación de acetil-CoA (Figura 5). El transporte de los ácidos grasos hasta los glioxisomas se produce gracias a la participación de transportadores de tipo ABC como CTS/PXA1/PED3 (del inglés *Comatose/Peroxisome ABC Transporter 1/ Peroxisome defective 3*) (Hayashi et al., 2001; Zolman et al., 2001; Footitt et al., 2002), aunque se han propuesto otros modelos (Fulda et al., 2004; Penfield et al., 2006). Las moléculas de ácidos grasos que entran en el glioxisoma son activadas mediante esterificación con CoA, proceso mediado por enzimas acil-CoA sintetetas (LACS, del inglés *Long-Chain Acyl-CoA Synthetases*) y constituyen el sustrato inicial de la  $\beta$ -oxidación (Fulda et al., 2004) (Figura 5). En esta serie de reacciones, un ácido graso de  $n$  carbonos es degradado secuencialmente en  $n/2$  moléculas de acetil-CoA, en reacciones que requieren la reducción de  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y la

formación de un NADH por cada molécula de acetil-CoA producida (Cooper y Beevers, 1969; Goepfert y Poirier, 2007). El acetil-CoA producido durante la  $\beta$ -oxidación es metabolizado en el glioxisoma en lo que se conoce como ciclo del glioxilato (Beevers, 1961; Baker et al., 2006) (Figura 5). Uno de los productos de este ciclo es el succinato, que se exporta hacia la mitocondria, en donde entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos dando lugar a la producción de malato (Eastmond y Graham, 2001), que sale de la mitocondria hacia el citosol donde se convierte en fosfoenolpiruvato, a partir del cual es posible generar hexosas fosfato mediante gluconeogénesis (Figura 5). A partir de estas es posible sintetizar sacarosa (Eastmond y Graham, 2001), un azúcar que las plantas emplean como forma de transporte de carbono.

### Cuerpos lipídicos en tejidos reproductivos y vegetativos

Aunque tradicionalmente el estudio de los LDs ha estado centrado principalmente en las semillas, los granos de polen contienen también un número importante de LDs, en donde participan aportando los lípidos necesarios para el crecimiento de la membrana durante el crecimiento del tubo polínico (Ischebeck, 2016). Igualmente, en las células oclusivas de los estomas, donde se localizan también en un número importante, los LDs parecen actuar como reserva de TAG, que serían catabolizados para proporcionar a la célula el ATP necesarios para realizar la apertura estomática (McLachlan et al., 2016).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de LDs en las células de los tejidos vegetativos, incluyendo hojas, tallos y raíces, aunque su función es por el momento, objeto de estudio (Chapman et al., 2012; Murphy, 2012). Los trabajos realizados con objeto de determinar la función de los LDs presentes en los tejidos vegetativos han permitido identificar algunas de las proteínas que componen estos orgánulos, constatándose que los LDs no constituyen meros depósitos de lípidos, sino que participarían tanto en procesos fisiológicos, como durante la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés (Pyc et al., 2017b).

El número de LDs en tejidos vegetativos, como las hojas, se incrementa notablemente durante la senescencia. Se desconoce el impacto fisiológico de este fenómeno, aunque es posible que sea una consecuencia del reordenamiento de lípidos que tiene lugar en las células durante esta etapa del ciclo vital de la planta. Estos LDs podrían almacenar de manera temporal ésteres de esteroles y TAGs derivados del desmantelamiento de las membranas celulares (Chapman et al., 2012; Troncoso-Ponce

et al., 2013; Shimada y Hara-Nishimura, 2015), además de constituir un modo de almacenar transitoriamente ácidos grasos libres tóxicos procedentes de la membranas. Los TAGs almacenados podrían dar lugar a sacarosa por medio de la gluconeogénesis gracias a la asociación con lipasas y peroxisomas, la cual puede ser fácilmente transportada a otra parte de la planta (Huang, 2018).

Los LDs también participan de forma activa durante procesos de respuesta a estrés, tanto de tipo biótico como abiótico. En este último caso la contribución procede principalmente de la localización en LDs de la proteína CLO3, cuya presencia en la célula se induce en respuesta a estrés salino, ABA y sequía (Takahashi et al., 2000). No obstante, también se ha observado un incremento en el número de LDs en respuesta a frío y calor (Gidda et al., 2016).

La importancia de los LDs en respuesta a estreses de tipo biótico también ha sido señalada en los últimos años. Se ha demostrado su acumulación en la zona periférica de la lesión ocasionada por el hongo *Colletotrichum higginsianum*, en donde son una fuente de oxilipinas con actividad antifúngica, que ayudaría a combatir la acción del patógeno. La oxilipina 2-HOT, responsable de esta actividad, es sintetizada gracias a la acción coordinada de dos enzimas localizadas en los LDs, como son la dioxigenasa  $\alpha$ -DOX1 y la peroxigenasa CLO3 (Shimada et al., 2014). Otra proteína relacionada con la respuesta de defensa de la planta y que también ha sido hallada en los LDs es la proteína CPK1. CPK1 es una proteína kinasa dependiente de calcio que incrementa la resistencia de la planta frente al ataque de patógenos y que además de localizarse en LDs también se encuentra en peroxisomas (Coca y San Segundo, 2010).

La participación de los LDs en procesos de respuesta a estrés y senescencia no es exclusiva de los LDs citosólicos, sino que también se ha observado en plastoglóbulos (Bréhélin y Nacir, 2013).

Recientemente, se han intensificado las investigaciones para identificar nuevas proteínas asociadas a LDs, algunos de las cuales se han desarrollado en tejidos vegetativos como las hojas. Sin embargo, no ha sido hasta finales de 2017 cuando se han publicado los primeros proteomas de LDs de tejidos vegetativos (Brocard et al., 2017).

## Proteínas asociadas a cuerpos lipídicos

Las proteínas relacionadas clásicamente con LDs en plantas son principalmente oleosinas, caleosinas y esteroleosinas, procedentes de estudios de LDs de semillas. Sin embargo, en los últimos años, se ha descubierto un importante número de proteínas relacionadas con LDs.

### Oleosinas

La mayor parte del conocimiento disponible acerca de los LD de plantas proviene de los estudios realizados en granos de polen y semillas de plantas oleaginosas (Pyc et al., 2017b), que acumulan gran cantidad de TAG en forma de LDs. El estudio del contenido proteico de los LDs de semillas ha mostrado que las oleosinas son las proteínas principales de estos orgánulos (Huang, 1996; Jolivet et al., 2004; Laibach et al., 2015). Estas proteínas de pequeño tamaño (15-26 kDa) poseen un dominio central hidrofóbico de unos 70 aminoácidos, altamente conservado que se encuentra flanqueado por regiones hidrofílicas de tamaño variable (Tzen y Huang, 1992; Huang, 1996; Abell et al., 2004; Hsieh y Huang, 2004; Huang y Huang, 2017). Este dominio central posee varias prolina conservadas en un espacio de 12 aminoácidos, que se conoce como dominio *proline-knot* (PX<sub>5</sub>SPX<sub>3</sub>P; donde X representa un residuo grande no polar) (Abell et al., 1997; Abell et al., 2004), que es fundamental para su localización en los cuerpos lipídicos. Las oleosinas recubren la superficie de los LDs, con el dominio hidrofóbico insertado a través de la monocapa de fosfolípidos, dentro del núcleo de TAG. Estas proteínas ejercen un papel estructural, regulando el tamaño como la estabilidad de los LDs presentes en las semillas (Siloto et al., 2006; Shimada et al., 2008; Chapman et al., 2012; Miquel et al., 2014) y evitando la coalescencia de múltiples LDs en un único orgánulo (Schmidt y Herman, 2008). Las plantas de *Arabidopsis* poseen un total de 17 oleosinas, 5 específicas de semillas, que constituyen hasta el 79% de la fracción proteica de los LDs (Jolivet et al., 2004; D'Andréa et al., 2007; Vermachova et al., 2011), 3 que se expresan tanto en semillas como en el polen y 9 (8 en tándem) que se expresan en las células del tapetum floral (Kim et al., 2002; Huang et al., 2013). Las oleosinas están ausentes de otro tipo de tejidos, aunque se localizan en LDs de hojas cuando se expresan de forma ectópica en plantas transgénicas (Beaudoin y Napier, 2000; Wahlroos et al., 2003; De Domenico et al., 2011).

Además de su función estructural, estas proteínas podrían ser empleadas como puntos de reclutamiento hacia la superficie de los LDs de otras proteínas, tales como

lipasas u otras enzimas empleadas en la degradación de los lípidos de reserva (Quettier y Eastmond, 2009; Wilfling et al., 2013). A este respecto se ha observado que la movilización de los lípidos de reserva en plántulas de *Arabidopsis* disminuye notablemente cuando se suprime la expresión de los genes de las oleosinas, aunque las lipasas de los TAGs no estén afectadas (Siloto et al., 2006). Esto ocasiona un incremento de tamaño de los LDs, y consecuentemente, una reducción de la relación superficie:volumen, que ralentizaría la acción de las lipasas y de otras proteínas durante el proceso de degradación de TAGs (Chapman et al., 2012).

### Caleosinas

Las caleosinas se encuentran asociadas a los LDs (Frandsen et al., 1996; Chen et al., 1999; Naested et al., 2000; Jolivet et al., 2004; Katavic et al., 2006) y al igual que las oleosinas, poseen un dominio central hidrofóbico con el motivo *proline-knot* que permite su anclaje en los LDs. Además, estas proteínas poseen una región N-terminal con un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  conocido como "*helix-loop-helix EF-hand*" y un dominio C-terminal con varios sitios de fosforilación (Chen et al., 1999). Se ha propuesto que estas proteínas podrían desempeñar una función estructural, ya que en algunas especies vegetales las caleosinas constituyen las proteínas principales de los LDs en lugar de las oleosinas (Jiang y Tzen, 2010). Varios estudios han señalado, además, el papel de estas proteínas en el catabolismo de lípidos, ya que de forma análoga a como sucede con las oleosinas, la pérdida de función de las caleosinas que se expresan en las semillas de plantas mutantes de *Arabidopsis* provoca un descenso en la tasa de degradación de ácidos grasos (Poxleitner et al., 2006).

El genoma de *Arabidopsis* contiene al menos 5 genes de caleosinas (*AtCLO1-AtCLO5*). *AtCLO1* se acumula principalmente en los LDs de las semillas, en donde también se detecta la presencia de *AtCLO2*, aunque en cantidades menores (Jolivet et al., 2004; Vermachova et al., 2011). Las proteínas *AtCLO3*, denominada también como *RD20* (del inglés *Responsive to Dessication-20*) y *AtCLO4* son específicas de cuerpos lipídicos de tejidos vegetativos (Aubert et al., 2010; Kim et al., 2011) y participan como reguladores positivos y negativos, respectivamente, de la respuesta a ABA durante los procesos de germinación y deshidratación (Aubert et al., 2010; Kim et al., 2011).

Se desconoce, sin embargo, los mecanismos moleculares por los que las diferentes caleosinas realizan su función. Estudios recientes han revelado que las proteínas *CLO1* (*ATS1*) y *CLO4* pueden actuar como peroxigenasas (Hanano et al., 2006; Meesapyodsuk

y Qiu, 2011; Blée et al., 2012), contribuyendo a la producción de oxilipinas (Partridge y Murphy, 2009; Aubert et al., 2010; Kim et al., 2011; Shimada et al., 2014). Entre las oxilipinas que se forman *in vitro* con la intervención de peroxigenasas se encuentran los hidróxidos de ácidos grasos insaturados (FAOHs), que se acumulan en la planta en respuesta al ataque de patógenos (Rustérucci et al., 1999; Blée, 2002; Hamberg et al., 2003; Göbel et al., 2002; Montillet et al., 2005) y que pueden tener un papel significativo durante la interacción de la planta con estos organismos. Recientes avances en este campo han mostrado que la proteína CLO3 podría catalizar la reducción de 2-HPOT, generado por la acción del enzima  $\alpha$ -DOX1, al hidróxido 2-HOT, para el que se han descrito diversas funciones tales como regulador del proceso de muerte celular que acompaña a la respuesta de defensa, y como compuesto con actividad antifúngica (Hamberg et al., 2003; Shimada et al., 2014).

#### Esteroleosinas

Constituyen el tercer grupo de proteínas asociadas clásicamente a los LDs de semillas. Son similares a nivel de secuencia a la familia de enzimas HSD de mamíferos (hidroxiesteroide deshidrogenasa asociada a cuerpos lipídicos) (Lin et al., 2002), por lo que se denominan comúnmente esteroles deshidrogenasas. Existen cada vez más evidencias de que estas proteínas poseen un papel importante en el metabolismo de brasinosteroides y de la señalización en plantas (dada la similitud de estos compuestos con los esteroides de mamíferos). Poseen solo dos dominios, con una región hidrofóbica en el N-terminal necesaria para su localización en los LDs, que aunque no contiene el dominio *proline-knot*, posee prolinas conservadas que formarían una variante, denominada como *proline-knob* (Lin et al., 2002; Chapman et al., 2012).

Entre las nuevas proteínas identificadas en los LDs encontramos:

#### $\alpha$ -DOX1

La proteína  $\alpha$ -DOX1 ha sido recientemente localizada en los LDs (Shimada et al., 2014) en concreto en los LDs que se forman en *Arabidopsis* durante la senescencia de la planta y la respuesta a la infección del hongo *Colletotrichum higginsianum*. La identificación de esta proteína y su caracterización enzimática ya había sido estudiada con anterioridad en procesos relacionados con la respuesta a patógenos y la senescencia (Sanz et al., 1998). Esta dioxigenasa podría participar junto con enzimas caleosinas en la

producción de oxilipinas a partir del ácido linolénico, que actuarían como moléculas señalizadoras en procesos de defensa frente a estreses de tipo biótico y abiótico (Shimada y Hara-Nishimura, 2015; Huang, 2018). Su localización en los LDs de tejidos senescentes ha sido confirmada posteriormente mediante estudios proteómicos (Brocard et al., 2017).

#### LDAP

Se denominan comúnmente Proteínas asociadas a cuerpos lipídicos (LDAPs, del inglés *Lipid Droplets-Associated Protein*). Fueron identificadas a partir de mesocarpo de aguacate (*Persea americana*), encontrándose dos miembros, LDAP1 y LDAP2, que comparten a su vez una gran similitud con las proteínas SRRP (del inglés *Small Rubber Particle Proteins*) (Horn et al., 2013). Las proteínas SRRP participan en la formación y estabilización de LDs que contienen poliisoprenoides en plantas productoras de caucho (*Hevea brassiliensis*) (Berthelot et al., 2016). Aunque el mesocarpo del fruto de *Persea* no contiene caucho, los LDs de TAG y los LDs de caucho en *Hevea* parecen ser orgánulos funcionalmente similares (Pyc et al., 2017a). Estudios posteriores han identificado una familia de 3 proteínas homólogas a las LDAP, que han sido denominadas de acuerdo a la misma nomenclatura como LDAP1-LDAP3 (Gidda et al., 2016). Todas ellas se localizan en la superficie de los LDs y parecen regular de alguna manera su proliferación, participando también en procesos de respuesta a estrés y crecimiento post-germinativo, lo que sugiere por tanto una función de los LDs en estos procesos (Kim et al., 2010; Kim et al., 2016; Pyc et al., 2017a). En un esfuerzo por encontrar nuevos componentes proteicos de los LDs, la búsqueda de interactores de LDAP permitió identificar la proteína LDIP (*LDAP-Interacting Protein*) y comprobar su localización en los LDs (Pyc et al., 2017a). Aunque se desconoce su función, se ha propuesto que las proteínas LDIP podrían participar en la regulación del tamaño de los LDs y en el mantenimiento de la homeostasis de lípidos neutros en hojas y semillas.

#### Seipinas

La maquinaria celular encargada de la biogénesis de los LDs parece estar conservada, al menos conceptualmente, entre los diferentes reinos (Pyc et al., 2017b). Esto ha permitido la identificación por homología al gen de humanos, de una familia de proteínas denominadas SEIPINAS, que en *Arabidopsis* consta de 3 miembros (*AtSEIPIN1-AtSEIPIN3*) (Cai et al., 2015). Su importancia en humanos deriva de los resultados que demuestran que la mutación del gen *SEIPIN* (*BSCL2*) ocasiona una



lipodistrofia congénita conocida como Berardinelli-Seip, caracterizada por la ausencia casi total de tejido adiposo y anormalidades en los LDs (Magré et al., 2001; Capeau et al., 2010). En eucariotas, los genes de seipinas codifican proteínas integrales de membrana que participan en la biogénesis de los LDs en el ER (Yang et al., 2012a; Wee et al., 2014). En *Arabidopsis*, los estudios llevados a cabo sobre estas proteínas han puesto de manifiesto que su presencia afecta al número de LDs y a la acumulación de TAGs (Cai et al., 2015), además de participar en la biogénesis de LDs en el embrión y en el polen (Taurino et al., 2018).

### CGI-58

Siguiendo el mismo razonamiento que para las seipinas, la búsqueda de proteínas con homología de secuencia en distintos organismos ha permitido la identificación del gen CGI-58 (del inglés *Comparative Gene Identification-58*) (James et al., 2010), cuya mutación en humanos ocasiona la enfermedad denominada Chanarin-Dorfman (Lass et al., 2006; Vieyres et al., 2016), en la que se produce una hiperacumulación de LDs en tejidos, células u órganos que normalmente no almacenan lípidos (Yamaguchi et al., 2004; Yamaguchi y Osumi, 2009). Este gen codifica el enzima  $\alpha/\beta$ -hidrolasa-5 (ABHD5), que se asocia con los LDs en determinadas condiciones metabólicas y que parece participar en el proceso de hidrólisis de los lípidos de reserva (Yamaguchi y Osumi, 2009). En *Arabidopsis*, la ausencia del gen homólogo (At4g24160), ocasiona un incremento del número de LDs en hojas adultas y un aumento de los niveles de TAGs (James et al., 2010). La proteína CGI-58 no interviene sin embargo en la acumulación de TAGs durante el proceso de maduración de la semilla ni en el proceso de movilización de reservas durante la etapa postgerminativa (James et al., 2010), aunque interacciona con otras proteínas implicadas en este proceso, modificando probablemente su actividad (Park et al., 2013). A pesar de estos estudios, se desconoce si esta proteína reside en los LDs o si su aparente presencia en este orgánulo es consecuencia de la interacción de los LDs con los peroxisomas en donde sí ha sido detectada.

### OBAP1

La proteína OBAP1 (del inglés *Oil Body Associated Protein-1*) ha sido identificada en plantas de maíz en un rastreo de plantas mutantes en genes que se expresasen principalmente en el escutelo durante la germinación (López-Ribera et al., 2014). El homólogo en *Arabidopsis* ha sido identificado y su pérdida de función ocasiona la formación de LDs aberrantes en semillas y un descenso del contenido en lípidos y la tasa

de germinación, aunque se desconoce su función en los LDs de tejidos vegetativos (López-Ribera et al., 2014).

#### CPK1

CPK1 (del inglés *Calcium dependent Kinase 1*) es una proteína kinasa dependiente de calcio que actúa como regulador del sistema inmune en *Arabidopsis* (Coca y San Segundo, 2010). Su sobreexpresión confiere resistencia al ataque de patógenos, mientras que su supresión incrementa su susceptibilidad. El hallazgo de esta proteína en los LDs supone una evidencia más de la participación de estos orgánulos en la inmunidad vegetal. No obstante, esta proteína se ha encontrado también en los peroxisomas, lo que podría explicarse bien por la existencia de interacciones entre LDs y peroxisomas, o bien por la participación del ER en el proceso de biogénesis de ambos orgánulos (Coca y San Segundo, 2010).

# Objetivos

## Objetivos

El presente trabajo se planteó con objeto de profundizar en el conocimiento de los cuerpos lipídicos (LDs) y de la función de estos orgánulos en tejidos vegetativos y en particular, en su posible participación en la síntesis de oxilipinas durante la respuesta de defensa de la planta. Para abordar este estudio nos propusimos examinar la formación de LDs durante la respuesta a la infección de *Pseudomonas syringae* DC3000 *avrRpm1* y la senescencia de la planta, para posteriormente proceder a la purificación de los LDs y a la determinación del contenido proteico de estos orgánulos. La composición proteica de los LDs ha sido analizada en comparación al proteoma completo de *Arabidopsis*, así como con proteomas obtenidos de LDs de semillas y otros tejidos vegetativos. La presencia en LDs de algunos componentes proteicos ha sido confirmada, aumentando el número de proteínas que hasta la fecha han sido asociadas a estos orgánulos.

# Material y métodos

## Material y métodos

### Material biológico, crecimiento y mantenimiento

#### *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) para la propagación y purificación de plásmidos. Las bacterias se cultivaron a 37°C en medio LB (Sambrook et al., 1989).

#### Especies bacterianas fitopatógenas

La cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido pGV226 se empleó para la transformación de plantas con las construcciones generadas (Deblaere et al., 1985). Las bacterias se cultivaron a 28°C en medio LB en presencia de rifampicina (100 ng/ $\mu$ L) empleado como antibiótico de selección.

Durante al presente trabajo se ha empleado el patógeno modelo *Pseudomonas syringae*, en concreto la cepas patógenas *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1* (*Pst* DC3000 *avrRpm1*, (Debener et al., 1991) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (*Psy* B728a) (Feil et al., 2005).

#### Medios de cultivo de bacterias y condiciones de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB): empleado para el cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Contiene 1% de bacto triptona, 0,5% de extracto de levadura y 1% de NaCl con el/los antibiótico/s correspondiente/s en cada caso. Para medio sólido se añadió 1,5% de agar como agente gelificante.

Medio King's B (KB): Empleado para el crecimiento de *Pseudomonas*. Contiene 2% proteosa peptona, 2% glicerol, 6,5 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 6 mM MgSO<sub>4</sub>, suplementado con el/los antibióticos correspondientes en cada caso (King et al., 1954). Para medio sólido se añadió 1,5% de agar como agente gelificante.

#### Mantenimiento de las cepas bacterianas

*E. coli* se cultivó a una temperatura de 37°C en medio LB, *Agrobacterium* se cultivó a una temperatura de 28°C en medio LB y *Pseudomonas* a 28°C en medio KB.

## Manipulación de microorganismos

### Obtención de células competentes

La obtención de células competentes DH5 $\alpha$  se realizó por tratamiento con CaCl<sub>2</sub>, siguiendo el método descrito por Inoue et al., (1990).

Para la obtención de células competentes C58C1 de *A. tumefaciens*, se preparó un precultivo de 5 mL de LB con los antibióticos de selección correspondientes, a partir de una colonia procedente de una placa reciente, y se incubó durante toda la noche a 28°C con agitación. Este precultivo se diluyó 40 veces con el mismo medio de selección y se volvió a incubar durante 5-6 horas con agitación. El cultivo resultante se centrifugó a 5000xg durante 10 min a 4°C y, posteriormente, el sedimento bacteriano fue resuspendido en 100 mL de Tris-HCl 100 mM pH 8 estéril. La suspensión bacteriana se centrifugó a 5000xg durante 10 min a 4°C, y el sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de medio LB. A partir de esta suspensión se prepararon alícuotas de 200  $\mu$ L que se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

### Transformación bacteriana

La transformación de células competentes DH5 $\alpha$  de *E. coli* se llevó a cabo mediante choque térmico a 42°C, según el protocolo descrito por Sambrook et al., (1989). Las células se sembraron en medio LB, suplementado con antibióticos necesarios, según el tipo de plásmido, para la selección de los transformantes, y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Para llevar a cabo la transformación de las células competentes de *A. tumefaciens* se descongeló una alícuota de 200  $\mu$ L en hielo y se le añadió 0,1-1  $\mu$ g del DNA plasmídico de interés. Las células se mantuvieron 5 min en hielo, 5 min en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) y otros 5 minutos a 37°C. Posteriormente se le añadió 1 mL de medio LB y se incubaron las células durante 1 h con agitación a 28°C. Se plaquearon 200  $\mu$ L en medio LB con los antibióticos de selección correspondientes y dichas placas se incubaron durante 2 días a 28°C.

### Vectores de clonación y transformación

-pDONR207 (Invitrogen): empleado para la clonación de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway, que permite la incorporación de fragmentos de DNA mediante recombinación homóloga, gracias a la presencia de las secuencias attP1 y

attP2. Este vector se denomina vector de entrada y se emplea para clonar un inserto, desde el cual será transferido posteriormente, también mediante recombinación homóloga, a un vector destino (pGWB5). Posee un gen marcador seleccionable de resistencia a gentamicina.

-pGWB5: los vectores de la serie pGWB se emplean como vectores destino a los que se transfieren los fragmentos de interés desde los vectores de entrada empleados en el sistema Gateway de clonación. Contienen las secuencias attR1 y attR2 de recombinación. Son vectores binarios, por lo que contienen un origen de replicación y un gen marcador seleccionable tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Este vector concretamente porta la secuencia del promotor 35S que queda en el extremo 5' del transgén a insertar y la secuencia correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP) que queda situada en el extremo C-terminal de la construcción.

### Crecimiento de plantas en tierra

Las semillas de *Arabidopsis* se imbibieron en agua y se vernalizaron durante 2 días a 4°C. Posteriormente se sembraron en bandejas de alvéolos sobre una mezcla de tierra con vermiculita en proporción 3:1. Las bandejas se cubrieron con plástico y se colocaron en una cámara de cultivo con 14 h de luz, 21°C de temperatura y 60% de humedad relativa. Pasados 4-5 días el plástico empleado para mantener una humedad relativa elevada fue retirado.

### Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transferencia de las construcciones preparadas en *Agrobacterium* hasta el genoma de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo mediante la técnica de inmersión floral (Clough y Bent, 1998).

### Selección de líneas transgénicas

Semillas procedentes de plantas transformadas (T1) fueron sembradas en placas Petri en medio MS y en presencia del antibiótico de selección kanamicina, y carbenicilina para evitar el crecimiento de *Agrobacterium*. Las plántulas resistentes fueron seleccionadas y pasadas a tierra hasta la obtención de semillas. Las semillas T2 se sembraron en presencia del antibiótico de selección con objeto de seleccionar líneas que presentasen una segregación 3:1 y que contenían por consiguiente una única inserción del T-DNA. Las semillas T2 resistentes fueron transferidas a tierra para recoger semillas



T3 e identificar plantas homocigotas para la construcción, sembrado una pequeña cantidad de semillas T3 y observando aquellas en las que no había segregación para el T-DNA.

## Tratamientos fitopatógenos

Previamente a la inoculación con *Pseudomonas syringae*, la cepa fue refrescada en placas de KB en presencia de el/los antibiótico/s necesarios e incubada durante toda la noche a 28°C. Las células se recogieron a partir del césped bacteriano empleando una solución estéril de  $\text{MgCl}_2$  10 mM y un asa de Digralsky. La suspensión bacteriana se preparó mediante dilución, hasta alcanzar la concentración deseada para la infección, considerando que una  $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$  se corresponde con una concentración de bacterias de  $10^8$  ufc/mL. Para la infección por infiltración se emplearon plantas regadas, que habían crecido en tierra durante 4 semanas en tierra. Se inocularon 3 hojas adultas del mismo verticilo por planta aplicando la bacteria directamente al apoplasto utilizando una jeringuilla de 1 mL sin aguja y aplicando la suspensión bacteriana en la cara abaxial de la hoja. La concentración de bacterias utilizada fue de  $10^6$  ufc/mL.

## Aislamiento y análisis de LDs

### Aislamiento de cuerpos lipídicos

El procedimiento de obtención de cuerpos lipídicos está basado en el protocolo de (Tzen et al., 1997), que emplea gradientes discontinuos de densidad, con varias modificaciones. Todos los pasos y centrifugaciones se llevaron a cabo a 4°C. Se recolectaron hojas de *Arabidopsis* (de diferente tiempo y tratamiento según experimento). Con unas tijeras se cortaron en pequeños trozos 2,5 g de hojas de *Arabidopsis*, que se homogeneizaron en mortero durante 2 minutos en 5 mL de tampón de extracción frío (10 mM de tampón fosfato sódico pH 7,5; 300 mM de NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20; 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo); cocktail inhibidor de proteasas (Sigma) y 0,6 M sacarosa), empleando arena de mar (Merck) como agente abrasivo. Para cada extracción completa se empleó un total de 5 g de hojas. El homogenado resultante se filtró a través de 3 capas de Miracloth (Calbiochem®), obteniéndose dos fracciones de unos 2,5 mL de cada 2,5 g de tejido. Cada una de estas fracciones se dispuso en el fondo en un

tubo de ultracentrífuga de 5 mL. Sobre ella se depositó cuidadosamente (vertiendo el líquido por la pared del tubo) 2,5 mL de tampón de extracción con 0,4 M en lugar de 0,6 M de sacarosa. Se centrifugó a 100 000xg durante 90 min (Horn et al., 2011) empleando una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100 XP, con un rotor SW55Ti. Se recogió la fracción superior de cada uno de los tubos con una micropipeta y se situaron ambas en el fondo de un tubo de ultracentrífuga. Encima de esta fracción se colocó 2,5 mL de tampón de extracción con 0,2 M de sacarosa en lugar de 0,4 M. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Se recogió la fracción superior que contiene los cuerpos lipídicos y se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se centrifugó a 10000xg durante 1 h en centrífuga de mesa. La fracción inferior, libre de cuerpos lipídicos se retiró mediante una pipeta Pasteur, obteniendo 50 µL de cuerpos lipídicos purificados. Los cuerpos lipídicos fueron teñidos con BODIPY 493/503 (Thermofisher) a una concentración final de 0,5 µg/mL y visualizados al microscopio de fluorescencia antes de almacenarse a -20°C para futuros análisis.

### Tinción de cuerpos lipídicos

La visualización de cuerpos lipídicos en hojas de *Arabidopsis* se realizó mediante tinción con BODIPY® 493/503 (Listenberger y Brown, 2007). Se preparó una solución stock disolviéndolo en DMSO y se empleó a una concentración final de 2 µg/mL en agua, en donde fueron sumergidas las hojas a teñir. La tinción de cuerpos lipídicos purificados se realizó a una concentración final de 0,5 µg/mL.

### Análisis mediante citometría de flujo

A partir de la fracción purificada y concentrada de cuerpos lipídicos, 5 µL de muestra se diluyeron con 195 µL de tampón fosfato (10 mM pH 7,5). Se añadió 1 µL de BODIPY 493/503 (100 µg/mL) para la tinción de lípidos neutros (concentración final de 0,5 µg/mL). A continuación las muestras se analizaron en un citómetro de flujo GALLIOS™ (Beckman Coulter Inc, Pasadena, CA, USA). Se empleó un láser de excitación de 488 nm, 22 mW para la excitación de BODIPY y se recogió la fluorescencia emitida se recogió con un filtro de paso de banda de 525-540 nm. Se tomaron medidas durante 90 segundos. Los datos fueron analizados con el software Kaluza® de Beckman Coulter.

## Análisis proteómico

El análisis de las proteínas de cuerpos lipídicos se realizó en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Se llevó a cabo mediante una aproximación *shotgun proteomics*. Las muestras fueron cargadas y concentradas individualmente en un gel SDS-PAGE del 12%. Cada muestra fue dividida en 3-4 bandas que fueron digeridas con tripsina, empleando un robot digestor automático Proteineer (Bruker, Bremen, Alemania). En todos los casos, la digestión fue llevada a cabo según el protocolo descrito por (Shevchenko et al., 1996). En resumen, las bandas del gel se lavaron con bicarbonato de amonio y las muestras fueron reducidas con DTT. El proceso de alquilación se llevó a cabo con ácido iodoacético (IAA) a temperatura ambiente antes de añadir la tripsina recombinante (0,1 mg, Promega) de grado de secuenciación. La digestión tuvo lugar durante 18 h a 37°C. A continuación, los péptidos generados se extrajeron, agruparon y se secaron en un *speed-vac* y almacenados a -20°C hasta su uso.

## Análisis LC-ESI-MSMS y búsqueda en bases de datos

El análisis Nano LC ESI-MSMS se realizó empleando un NanoLC-1D HPLC (Eksigent) acoplado a un espectrómetro de masas QTOF 5600 Triple TOF (Sciex, Framingham, MA, USA). Los datos de MS y MS/MS obtenidos se emplearon para lanzar una búsqueda frente a la base de datos de *Arabidopsis thaliana* que contenía 31478 entradas (descargadas de UniProtKB, Febrero de 2016). La búsqueda se realizó empleando el motor Mascot v.2.6 (<http://www.matrixscience.com>). Los péptidos con puntuaciones de iones Mascot que indicaban identidad u homología extensa ( $p < 0,05$ ) se emplearon para la identificación de proteínas. Únicamente proteínas con puntuaciones superiores a 30 fueron consideradas. De igual modo, solamente las proteínas detectadas en las tres réplicas biológicas examinadas en cada tratamiento se consideraron para posteriores análisis como constituyentes de cuerpos lipídicos.

## Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

La infiltración con *Agrobacterium* de hojas de *Nicotiana benthamiana* se llevó a cabo básicamente como se describe en (Herpen et al., 2010). Se inoculó *Agrobacterium* con la construcción deseada en 5 mL de LB suplementado con Rifampicina (100 µg/mL) y Kanamicina (50 µg/mL) y se dejó crecer durante 24 h a 28°C en agitación. Al día siguiente

se agregó 5 µL de acetosiringona 200 mM (Sigma-Aldrich) y se dejó durante 3 h más en agitación a 28°C. El cultivo resultante se centrifugó durante 10 min a 3000xg y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio de infiltración (10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES pH 5,8). Se midió la densidad óptica a 600 nm y se prepararon 5 mL a una densidad óptica de 0,3. En todos los experimentos se añadió una cepa de *Agrobacterium* portadora del gen que codifica para la proteína P19 de TBSV, supresora del silenciamiento génico, para maximizar la producción de proteína. Se añadió 5 µL de acetosiringona y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente sin agitación. En los experimentos en que se coinfiltró además con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, se añadió la bacteria a concentración final de 10<sup>4</sup> cfu/mL. Plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron durante 4 semanas en invernadero en condiciones de ciclo largo 16 h de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de entre 18 y 22°C. La mezcla de bacterias se infiltró en hojas de *N. benthamiana* por la parte abaxial, empleando para ello un jeringa de 1 mL sin aguja. Las plantas agroinfiltradas se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura durante 3 días, momento en el que se visualizaron al microscopio confocal.

## Microscopía confocal

La obtención de imágenes al microscopio confocal se llevó a cabo en la plataforma de confocal Leica TCS SP8 empleando objetivos de 20x y de 63x de inmersión en agua. Tanto para BODIPY493/503 como para GFP se empleó el láser de excitación de 488 nm. La fluorescencia emitida se recogió entre 500 y 550 nm en el caso de BODIPY y entre 500 y 561 en el caso de GFP. En LDs aislados donde se realizó la colocalización de GFP con rojo nilo, se empleó un láser de 543 nm y se recogió la fluorescencia emitida entre 590 y 640 nm. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software FIJI (Schindelin et al., 2012).

## Extracción de proteínas y SDS-PAGE

Las muestras de tejido vegetal fueron homogenizadas en un homogeneizador Glas-Col en tampón de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Posteriormente se procedió a la centrifugación durante 15 min a 4°C y 13000xg. Se tomó el sobrenadante y se procedió de nuevo a centrifugar las muestras en las mismas condiciones. Este

segundo sobrenadante fue considerado el extracto de proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó empleando BioRad Protein Assay (Biorad) basado en el método de cuantificación de Bradford (Bradford, 1976). De cada muestra se empleó un total de 20 µg de muestra para correr un gel SDS-PAGE del 10%.

## Western Blot

Las proteínas fueron transferidas mediante electrotransferencia (100 V durante 1 h en tampón de transferencia) a membranas de nitrocelulosa (GE HealthCare), que fueron teñidas con Rojo Ponceau 0,1% para confirmar la correcta transferencia. Para la detección de proteínas específicas por inmunomarcaje, se bloquearon los sitios no ocupados de la membrana durante 1 h con leche en polvo al 5% en tampón TBST (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,5). Posteriormente se lavó tres veces la membrana durante 10 min en TBST y se incubó con el anticuerpo específico (anti-GFP conjugado), siguiendo las sugerencias del fabricante durante toda la noche a 4°C. Se retiró el anticuerpo y se lavó de nuevo la membrana tres veces durante 10 min con TBST, se secó la membrana y se incubó con el reactivo revelador SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) durante 3 min. El revelado de las bandas se realizó empleando películas fotosensibles (Konica Minolta) utilizando un equipo revelador SRX-101A (Konica Minolta).

## Técnicas de ácidos nucleicos

### Preparación y aislamiento de plásmidos

Para la purificación de DNA plasmídico a pequeña escala, a partir de 5 mL de cultivo bacteriano) se utilizó el método de lisis alcalina con el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen).

### Extracción de RNA de tejido vegetal

El RNA de las muestras vegetales se extrajo según el método descrito por (Logemann et al., 1987). El tejido vegetal fue homogeneizado en tampón Z6 (8M cloruro de guanidinio, 20 mM MES, 20 mM EDTA). Los restos de tejido insoluble fueron eliminado mediante centrifugación. El RNA se extrajo con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). El RNA se precipitó a 20°C durante la noche añadiendo 0,05 volúmenes de ácido acético 1M

y 0,7 volúmenes de etanol. Tras la obtención del precipitado mediante centrifugación a 13000xg durante 10 min, se lavó primero con  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$  3M pH 4,5 y luego con etanol 75%, obteniéndose en cada caso un precipitado que se recoge mediante centrifugación a 13000xg durante 10 min. Se dejó secar unos minutos y se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ.

### Preparación de DNA complementario

Las muestras de RNA se limpiaron empleando el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Se preparó el cDNA correspondiente a un máximo de 1  $\mu\text{g}$  de RNA usando el kit Transcription First Strand cDNA synthesis Kit (Roche).

### Amplificación de fragmentos de DNA

La amplificación de fragmentos de DNA específicos se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer). Los oligonucleótidos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

### Electroforesis de DNA

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en tampón TBE 0,5x / 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8) empleando un transiluminador (BioRad).

### Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se realizó en Secugen y las secuencias fueron analizadas mediante el programa Geneious®.

### Sistema Gateway de clonación

Este sistema permite la clonación de fragmentos de DNA mediante recombinación homologa en vectores diseñados específicamente para tal fin. Siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen), los fragmentos de interés se amplificaron mediante PCR empleando oligonucleótidos a los que se les añade los extremos attB1 (5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN (secuencia específica)-3' y attB2 (5'-GGGG-GAC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN - (secuencia específica) – 3'), que proporcionan al fragmento amplificado los sitios de recombinación attB. Los fragmentos amplificados se introdujeron en el vector de entrada pDONR207 mediante la reacción BP

con la enzima clonasa, de donde fueron transferido posteriormente al vector destino pGWB5, mediante la reacción LR con la enzima clonasa LR.

Todos los oligonucleótidos empleados para la clonación de los distintos genes se muestran en la Tabla I.

| Tabla I Oligonucleótidos empleados para el clonaje de los genes examinados. |           |   |
|---|-----------|---|
| Gen   | Locus     | Secuencia de oligonucleótidos   |
| <b>CLO3</b>   | at2g33380 | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTAAGAGAGAGAGAATGGCAGGAG 3'<br>5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTCTTGTTCGAGAATTGGCCC 3' |
| <b><math>\alpha</math>-DOX1</b>   | at3g01420 | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCAAGAAATTTAACAGAATGAA 3'<br>5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGAGGGAATTCGAGAGATA 3'     |
| <b>LOX1</b>   | at1g55020 | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCAAAAAGATGTTTCGAGAGAA 3'<br>5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGATAGAGACGCTATTTGGAAT 3'   |
| <b>GPAT4</b>  | at1g01610 | 5' AAAAAGCAGGCTATGTCTCCGGCGAAGAAGAGC 3'<br>5' AGAAAGCTGGGTACTCCATGGACTTGGTCTTATTG 3'                                    |
| <b>GPAT8</b>  | at4g00400 | 5' AAAAAGCAGGCTATGTCTCCGGAGAAGAAGAGTC 3'<br>5' AGAAAGCTGGGTACTTCTTGGTGTGTTGATAGAC 3'                                    |
| <b>ALDH3F1</b>  | at4g36250 | 5' AAAAAGCAGGCTATGGAAGCTATGAAGGAGACTG 3'<br>5' AGAAAGCTGGGTATCTTTTAAGACCAAGCATAAGG 3'                                   |
| <b>PAD3</b>   | at3g26830 | 5' AAAAAGCAGGCTATGTCTGGTTTCTCTGTTTCC 3'<br>5' AGAAAGCTGGGTAGTGGTGAAGAACTTGAAAGAA 3'                                     |

## Aplicaciones bioinformáticas

Los diferentes proteomas obtenidos fueron categorizados funcionalmente en base a la anotación GO mediante *The Arabidopsis Information Resource Bulk Data Retrieval y Analysis Tools* (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>).

Los diagramas de Venn fueron generados gracias a la herramienta web BioVenn (<http://www.biovenn.nl/>) (Hulsen et al., 2008).

El análisis de secuencias de DNA se realizó mediante el software FinchTV (Bio-Soft Net, <http://en.bio-soft.net/dna/FinchTV.html>).

El análisis de enriquecimiento para GO en los diferentes proteomas fue realizado mediante agriGo v2.0 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php>) (Tian et al., 2017) empleando un test Fisher como método estadístico y el método de corrección de Bonferroni, con un nivel de significando de 0,05. Los resultados fueron representados

mediante REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al., 2011), permitiendo una similitud de media de 0,7 y utilizando la base de datos de *Arabidopsis thaliana*.



# Resultados

## Resultados

### Los LDs se inducen durante la senescencia y la respuesta de *Arabidopsis* a la infección con *Pst* DC3000 *avrRpm1*

En el momento de iniciar el presente trabajo, el artículo publicado por Shimada et al., (2014) había descrito la localización de la proteína  $\alpha$ -dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX1) en los cuerpos lipídicos (LDs) que se forman en *Arabidopsis* durante la senescencia de la planta, así como durante la respuesta a la infección del hongo *Colletotrichum higginsianum*. Además, este mismo artículo indicaba la participación de las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3, esta última presente también en los LDs, en la síntesis de la oxilipina 2-HOT con actividad antifúngica (Shimada et al., 2014).

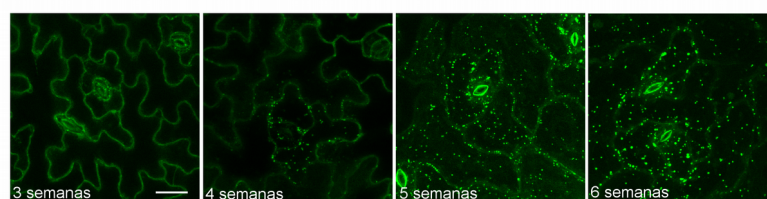
Estos resultados otorgaban a los LDs un papel en la síntesis de oxilipinas durante el proceso de senescencia de la planta y en la respuesta de defensa vegetal frente a la infección de microorganismos patógenos, cuya contribución nos propusimos investigar en mayor detalle en el presente trabajo. De particular interés para nuestro estudio era examinar la relación entre la función de los LDs y la síntesis de oxilipinas, y determinar si, además de las enzimas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3, en estos orgánulos se localizaba alguna otra proteína con participación en el metabolismo de oxilipinas.

Para abordar nuestro objetivo era necesario poner a punto un protocolo que nos permitiera obtener LDs en cantidad suficiente para realizar un análisis proteómico. Los estudios previos a este trabajo habían puesto de manifiesto que la expresión de los genes de  $\alpha$ -DOX se activa durante la senescencia de la planta, así como en respuesta a la infección de bacterias fitopatógenas del género *Pseudomonas* (Sanz et al., 1998; De León et al., 2002) y que, por tanto, ambos procesos serían adecuados para proceder a examinar la formación y el contenido proteico de los LDs.

Además de en las semillas, en donde existe un alto contenido en LDs que disminuye progresivamente durante el establecimiento de la plántula (Graham, 2008), la acumulación de LDs se induce durante la senescencia de la planta (Bouvier-Navé et al., 2010; Shimada et al., 2015). En ambas condiciones (semillas y senescencia) se han realizado análisis proteómicos que han aportado datos de interés acerca de la composición proteica de estos orgánulos (Jolivet et al., 2004; Brocard et al., 2017).

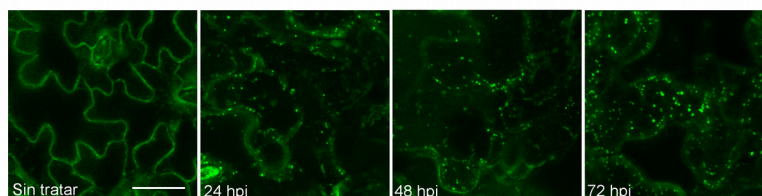
Igualmente, se ha descrito la formación de LDs en respuesta a distintas condiciones de estrés (Pyc et al., 2017b), aunque los datos relativos a la formación y composición de estos orgánulos en estas situaciones son escasos por el momento.

Para iniciar nuestro estudio, procedimos a examinar la formación de LDs en hojas de *Arabidopsis* en distintas etapas del desarrollo y en respuesta a la infección de *Pseudomonas* mediante la tinción de los tejidos de interés con el colorante específico de lípidos neutros BODIPY<sup>493/503</sup>. En estos análisis la tinción con BODIPY de hojas de la roseta basal de *Arabidopsis*, seguido de su observación con el microscopio confocal, puso de manifiesto el aumento progresivo del número de LDs durante el desarrollo de la planta (Figura 6). Así, mientras que en plantas de 3 semanas las hojas aparecen libres de LDs, estos orgánulos comienzan a acumularse de manera heterogénea en hojas de plantas de 4 semanas. El número de LDs aumenta notablemente en plantas de 5 y 6 semanas de edad, en las que se observa una distribución homogénea de estos orgánulos en las células de las hojas examinadas (Figura 6).



**Figura 6. Acumulación de LDs en hojas de *Arabidopsis*.** La formación de LDs en hojas de la roseta basal de plantas de *Arabidopsis* de 3, 4, 5 y 6 semanas de desarrollo se examinó mediante tinción con BODIPY<sup>493/503</sup> y observación al microscopio confocal. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Para examinar la formación de LDs durante el proceso de infección se inocularon plantas de entre 3 y 4 semanas con una suspensión de *Pst* DC3000 *avrRpm1* ( $10^6$  ufc/mL) inductora de una reacción de defensa denominada reacción hipersensible (HR), caracterizada por la activación de un proceso de muerte celular que contribuye a limitar la progresión del patógeno en el tejido infectado. La tinción de hojas inoculadas con BODIPY y su observación al microscopio confocal, a distintos tiempos de infección, pusieron de manifiesto un ligero incremento en el número de LDs en la zona inoculada, que aumenta de forma progresiva a medida que avanza el proceso de infección (Figura 7). La formación de LDs y el incremento de estos orgánulos ocurre de forma reproducible en las muestras examinadas, aunque su distribución en las zonas infectadas es



**Figura 7. Acumulación de LDs durante la respuesta a la infección de la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1*.** Se examinó la formación de LDs en hojas de *Arabidopsis* de 4 semanas de crecimiento a las 24, 48 y 72 hpi mediante tinción con BODIPY493/503 y observación al microscopio confocal. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

heterogénea de acuerdo, probablemente, al nivel de daño provocado por la infección en las células examinadas.

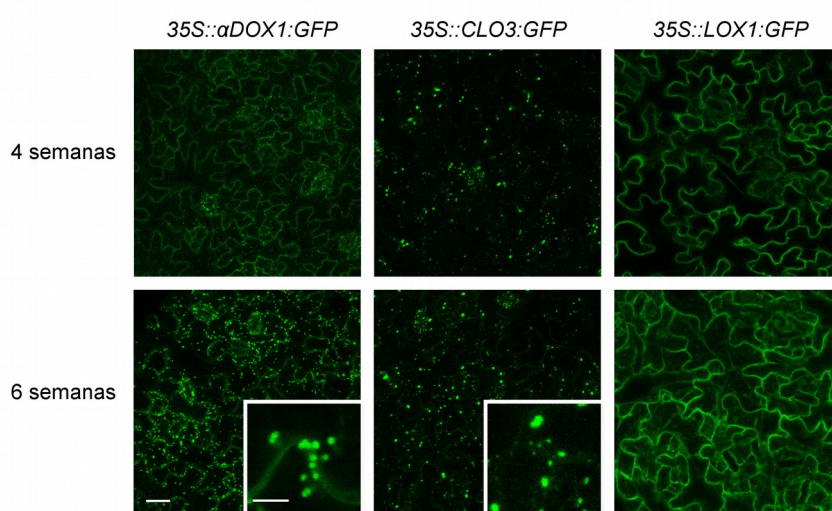
## Las proteínas $\alpha$ -DOX1 y CLO3 de *Arabidopsis* se localizan en los cuerpos lipídicos que se forman en las hojas de plantas senescentes

Tras determinar las condiciones de desarrollo en las que tiene lugar la formación de LDs en *Arabidopsis*, y antes de proceder a establecer el protocolo de purificación que nos permitiera obtener cantidades suficientes de LDs para determinar su proteoma, nos propusimos examinar la presencia de las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3 en dichos orgánulos. A este objeto procedimos a generar plantas transgénicas conteniendo las construcciones 35S:: $\alpha$ -DOX1:GFP y 35S::CLO3:GFP, en las que las proteínas de interés se expresaban como proteínas de fusión unidas a la proteína verde fluorescente GFP. Estas líneas transgénicas nos permitirían confirmar la presencia de las proteínas de interés en los LDs, y utilizar las proteínas de fusión como marcadores de LDs para establecer el protocolo de purificación de estos orgánulos.

En este punto se procedió a generar además, la línea 35S::LOX1:GFP, en la que la proteína LOX1, con actividad 9-lipoxigenasa (9-LOX) se expresó, igualmente, fusionada a la proteína verde fluorescente GFP. Utilizando esta construcción nos propusimos investigar la localización en los LDs de la proteína LOX1, para la que se ha demostrado una interacción metabólica con las proteínas de interés,  $\alpha$ -DOX1 y CLO3. Así, se ha demostrado que las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y 9-LOXs compiten por el *pool* de ácidos grasos disponibles como sustrato durante la infección bacteriana, y que durante la misma

respuesta, ambas enzimas actúan de forma coordinada en la síntesis de oxilipinas doblemente oxigenadas (Hamberg et al., 2003; Velloso et al., 2007). Igualmente, los productos de las enzimas 9-LOXs pueden ser reducidos por la actividad de caleosinas específicas (Hanano et al., 2016). Estas interacciones estarían de acuerdo con la colocalización de las tres enzimas descritas en un mismo compartimento celular, aunque no existían evidencias experimentales que indicasen la localización de la proteína LOX1 en los LDs de *Arabidopsis*. En apoyo de esta idea cabe mencionar la presencia de una lipoxigenasa en LDs de plantas de pepino (Feussner y Kindl, 1992; Feussner et al., 2001), así como de enzimas 9-LOX y 13-LOX en un *pool* de proteínas candidatas a formar parte de LDs en *Arabidopsis* (Shimada et al., 2014).

Para verificar la localización subcelular de las proteínas  $\alpha$ -DOX1:GFP y CLO3:GFP, se procedió a examinar la presencia de las proteínas de fusión en hojas de plantas homocigotas de 4 y 6 semanas mediante microscopía confocal. En ambos casos se observó la presencia de las proteínas  $\alpha$ -DOX1:GFP y CLO3:GFP en orgánulos de naturaleza esférica y de un tamaño que en ningún caso era mayor de 2  $\mu$ m, que se corresponderían con LDs (Figura 8). Además, de acuerdo a lo esperado, el número de LDs acumulados era superior en las hojas de plantas senescentes que en las plantas de 4 semanas (Figura 8). A diferencia de estos resultados, la fluorescencia correspondiente



**Figura 8. Localización subcelular de las proteínas  $\alpha$ -DOX1, CLO3 y LOX1 en hojas de *Arabidopsis*.** Imágenes de microscopía confocal de hojas de plantas transgénicas 35S::*gen:GFP* de *Arabidopsis* en plantas de 4 y 6 semanas de desarrollo. Barra = 20  $\mu$ m. Barra de detalle = 5  $\mu$ m.

a la proteína LOX1:GFP no aparecía asociada a LDs en ninguno de los tiempos examinados, sino que estaba preferentemente localizada en el retículo endoplásmico y en la membrana plasmática de las muestras examinadas. Estos experimentos permiten confirmar la localización de las proteínas CLO3 y  $\alpha$ -DOX1 en los LDs de las hojas y descartan la colocalización de la proteína LOX1 en estos orgánulos.

## Aislamiento de LDs de hojas senescentes mediante gradientes de densidad

En el momento de comenzar el presente trabajo se disponía de datos relativos al proteoma de LDs de semillas de *Arabidopsis* (Jolivet et al., 2004; Vermachova et al., 2011) pero no existía información acerca del proteoma de LDs procedentes de tejidos vegetativos. Por ello y con objeto de determinar las proteínas que, junto a las enzimas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3, integran los LDs en los tejidos vegetativos procedimos a establecer un protocolo de aislamiento y purificación de LDs, utilizando hojas de plantas de 6 semanas con un alto contenido en LDs. A este objeto se utilizó la línea transgénica marcadora 35S::*CLO3:GFP* para facilitar el seguimiento de estos orgánulos.

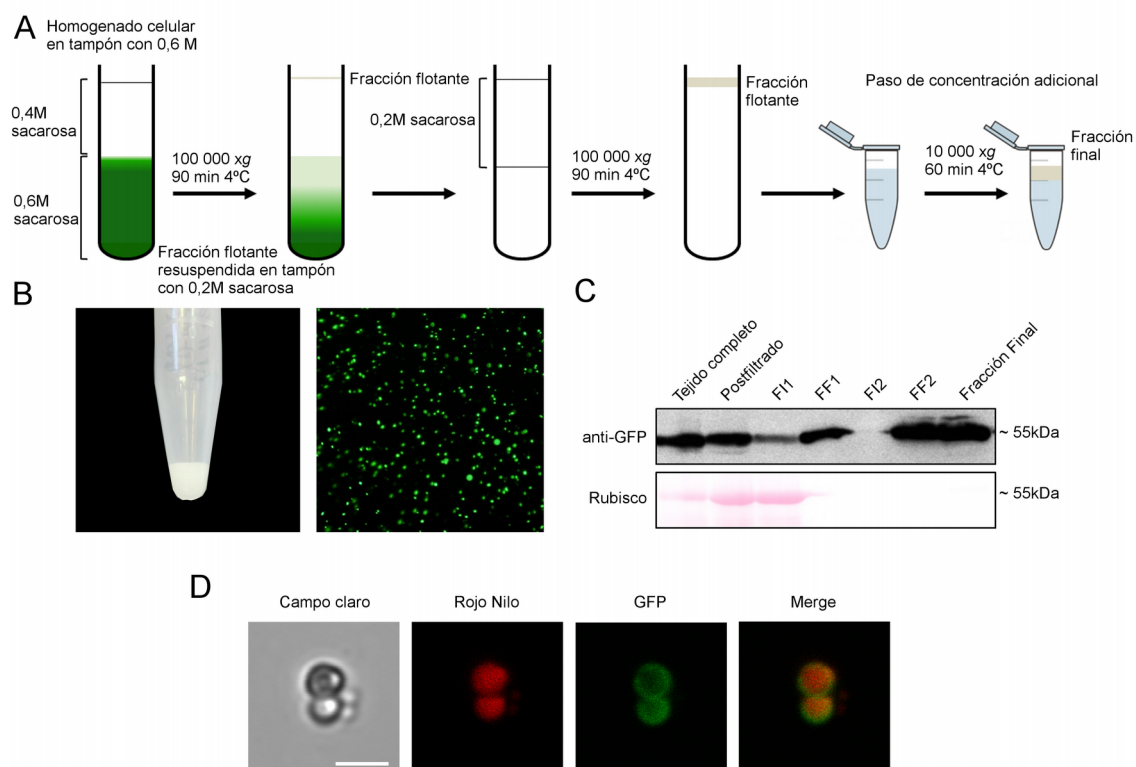
Los protocolos utilizados en la preparación de LDs aprovechan el hecho de que la presencia de un núcleo de TAGs en estos orgánulos reduce su densidad, permitiéndoles flotar en un gradiente discontinuo de densidad, en el que, tras la centrifugación de las muestras, los LDs ascienden a la superficie separándose del resto de orgánulos celulares de mayor densidad (Ding et al., 2013).

Al igual que en la purificación de otros orgánulos, la preparación y extracción de las muestras presenta varias fases críticas. En primer lugar, la fase de homogenización del tejido debe permitir la salida de los LDs, evitando a su vez que los LDs más grandes puedan romperse por fuerzas mecánicas. En este aspecto, y una vez establecido el protocolo de purificación que ha resultado de las distintas pruebas realizadas, hemos podido concluir que la utilización de tejido fresco como material de extracción constituye un factor crítico que permite mejorar de forma significativa y reproducible el rendimiento del protocolo. De la misma manera, y utilizando como base un tampón de extracción conteniendo sacarosa 0,6M, en nuestro trabajo hemos examinado el rendimiento del protocolo tras añadir al tampón de extracción compuestos tales como: NaCl y Tween-20. Los compuestos examinados habían sido empleados por distintos grupos de

investigación con objeto de mejorar la capacidad de extracción, evitando la presencia de proteínas contaminantes procedentes de otros orgánulos, y minimizando a su vez la pérdida de proteínas que, formando parte de los LDs, pudieran estar asociadas a estos orgánulos de forma más débil que otros componentes (Li et al., 2012). A este respecto, tenemos que mencionar que mientras que la presencia de NaCl no modifica significativamente el rendimiento, la adición de Tween-20 (0,04%) al tampón de extracción y su mantenimiento en las distintas etapas de la purificación provoca una mejora de aproximadamente 10 veces en el número de cuerpos lipídicos obtenidos a partir de una misma cantidad de tejido.

Finalmente, durante el procedimiento de purificación, en el que se realizaron dos etapas sucesivas de centrifugación en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa (desde 0,6 M hasta 0,2 M) (Figura 9A), se examinó también el efecto de la velocidad de centrifugación que fue superior a la empleada en los procedimientos de purificación de LDs a partir de semillas. En el protocolo se incorporó un último paso de centrifugación a baja velocidad con objeto de reducir el volumen final de la muestra y obtener un fracción concentrada de LDs que nos permitiera realizar un análisis proteómico de las muestras obtenidas. En la Figura 9 se muestra un esquema que recoge los pasos del protocolo establecido (Figura 9A), así como el aspecto de la fracción de LDs purificada y su visualización al microscopio de fluorescencia (Figura 9B). Se muestra, además, un *western blot* en el que se observa la presencia de la proteína CLO3:GFP en las distintas fracciones obtenidas a lo largo de la purificación, comenzando por el extracto completo, las fracciones flotantes recogidas en cada una de las centrifugaciones (FF1 y FF2), las fracciones que corresponden al fondo del tubo de ensayo en cada caso (FI1 y FI2) y la fracción final de LDs. En la Figura 9C se observa que en el segundo paso de ultracentrifugación, la fracción flotante 2 contiene altos niveles de proteína CLO3:GFP, mientras que el fondo del tubo se encuentra libre de esta proteína, poniendo de manifiesto que el proceso de purificación establecido permite recoger la mayor parte de los cuerpos lipídicos presentes en el tejido original.

Finalmente, en la Figura 9D se muestran imágenes obtenidas con el microscopio confocal en las que se aprecia el aspecto de los LDs purificados visualizados en campo claro y teñidos con el colorante Rojo Nilo específico de lípidos neutros. Además se observa la presencia de la proteína CLO3:GFP fluorescente verde que se localiza,



**Figura 9. Procedimiento de obtención de LDs a partir de hojas de plantas transgénicas *35S::CLO3:GFP* de *Arabidopsis* mediante gradientes de densidad.** A) Representación esquemática del proceso de purificación de LDs. B) Fracción final de LDs (izquierda) y visualización al microscopio óptico de fluorescencia de los LDs purificados (derecha). C) Análisis mediante *western blot* de las distintas fracciones recogidas durante el proceso de purificación de LDs. F11: fracción inferior correspondiente a la primera centrifugación. FF1: fracción flotante recogida de la primera centrifugación. F12: fracción inferior obtenida en la segunda centrifugación. FF2: fracción flotante recogida en la segunda centrifugación. D) Observación al microscopio confocal de los LDs purificados: se muestra el aspecto y tamaño de los LDs en campo claro, teñidos con Rojo Nilo, la fluorescencia correspondiente a la proteína GFP y la colocación de ambos colores. Barra = 2 μm.

preferentemente, en la superficie de los LDs, tal y como había sido descrito previamente (Aubert et al., 2010).

## Preparación de LDs de hojas senescentes y hojas infectadas de plantas silvestres y validación del protocolo de purificación

El protocolo de purificación de LDs establecido mediante el uso de la línea transgénica *35S::CLO3:GFP*, se utilizó para proceder a la obtención de LDs en plantas silvestres de *Arabidopsis* y determinar el proteoma de estos orgánulos. A este objeto, se

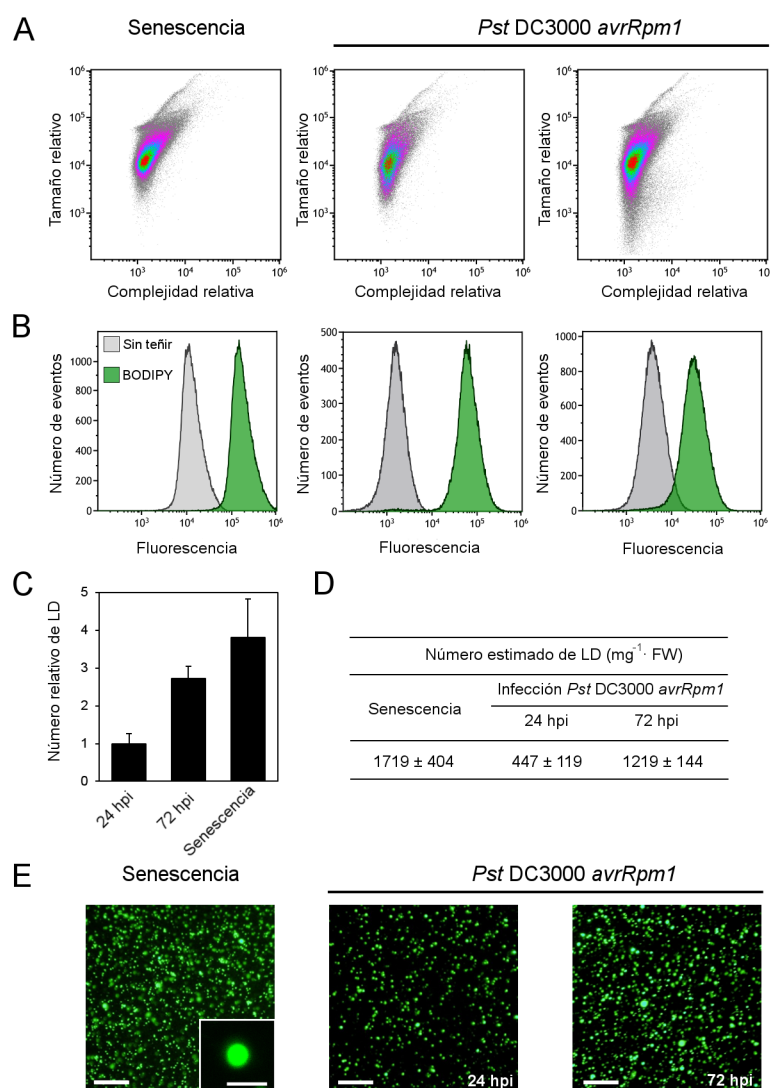


prepararon LDs de hojas senescentes, así como de hojas de plantas de 4 semanas infectadas con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1*, a las 24 y 72 hpi. En cada una de las condiciones mencionadas se prepararon tres réplicas biológicas independientes que se analizaron de forma paralela para determinar la composición proteica de los LDs purificados.

Como paso previo a estos análisis, y con objeto de determinar la pureza de las fracciones obtenidas, así como la cantidad de LDs y el rendimiento en relación al tejido utilizado, las muestras obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo. Esta tecnología permite medir y analizar simultáneamente el tamaño de las partículas presentes en una suspensión, la complejidad de la muestra y la fluorescencia asociada. Este método y su variante de separación de células en base a su fluorescencia (FACS, del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) habían sido utilizados en microalgas y otros organismos unicelulares en el aislamiento de mutantes hiperacumuladores de lípidos (Velmurugan et al., 2013; Xie et al., 2014; Terashima et al., 2015), al igual que en células de mamíferos con objeto de cuantificar la cantidad de LDs presentes en el interior de las células (Gubern et al., 2008) o monitorizar la biogénesis de LDs.

El análisis mediante citometría de flujo de los LDs purificados se llevó a cabo utilizando alícuotas sin teñir y teñidas con BODIPY de cada una de las muestras preparadas (Figura 10). En todos los casos se evaluó el contenido de las partículas y el tamaño de las mismas y se procedió a examinar las imágenes obtenidas. Los resultados de estos análisis mostraron que las fracciones examinadas contenían poblaciones homogéneas de LDs en las que no se observaba la presencia de otro tipo de partículas u orgánulos ya que todas ellas se teñían con el colorante específico de LDs BODIPY (Figura 10A y 10B). Estos análisis nos permitieron, además, calcular la cantidad relativa de LDs en las distintas muestras examinadas (Figura 10C). Así, pudimos calcular que en nuestras condiciones experimentales, el número de LDs aumenta durante la infección de forma que la cantidad de eventos registrados a las 72 hpi es aproximadamente 3 veces superior que la obtenida a las 24 hpi (Figura 10C). No obstante, en todos los casos, el número mayor de eventos correspondió a las muestras de LDs aislados a partir de hojas senescentes siendo 1,5 veces superior al contabilizado a las 72 hpi durante la infección. El análisis de los eventos contabilizados puso de manifiesto que su tamaño era similar en las muestras correspondientes a hojas senescentes y a las obtenidas a las 24 hpi, y que este tamaño era ligeramente variable en el caso de las muestras de LDs obtenidas a las

72 hpi (Figura 10A). Los resultados de estos análisis confirman la validez y fiabilidad del procedimiento utilizado para la purificación de LDs, y pone de manifiesto que las fracciones obtenidas se encuentran libres de otro tipo de vesículas u orgánulos celulares.



**Figura 10. Análisis mediante citometría de flujo de fracciones de LDs purificadas.**

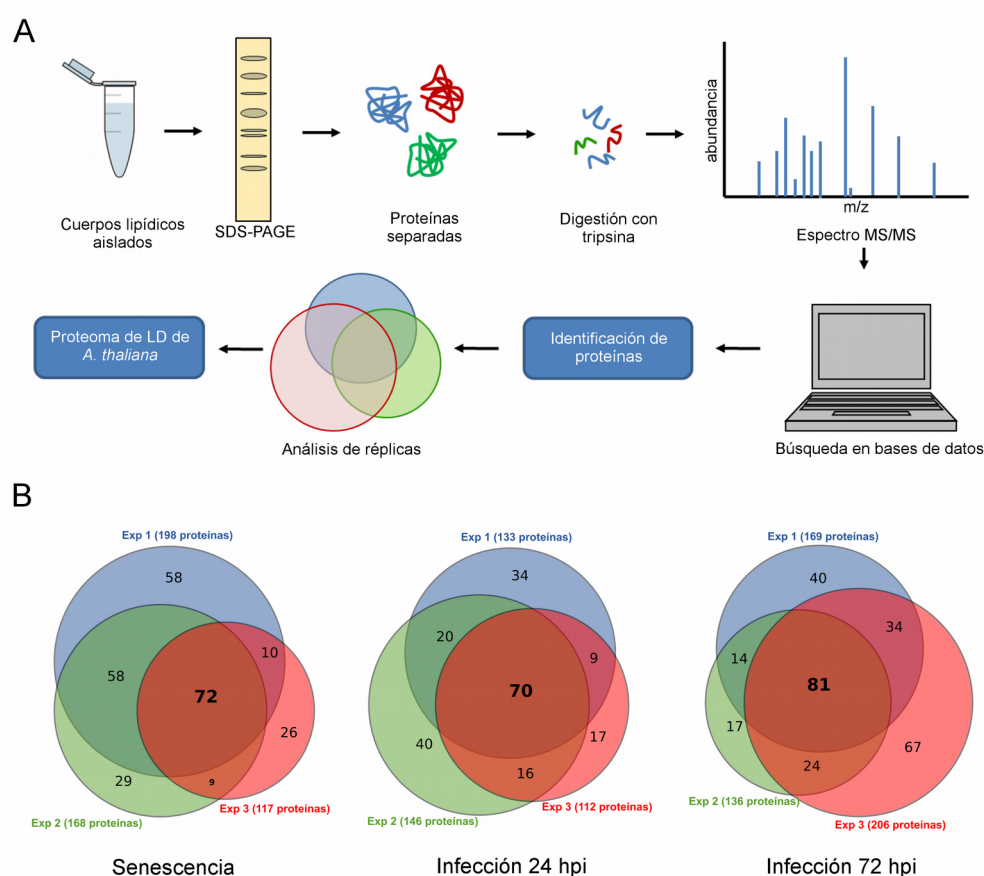
A) Representación gráfica mostrando tamaño (FSC) vs complejidad (SSC) relativa. B) Grado de pureza de las fracciones de LDs mediante representación del número de eventos vs fluorescencia en muestras sin tñir y tñidas con BODIPY<sup>493/503</sup>. C) Cuantificación relativa de los LDs obtenidos en las diferentes muestras. D) Estimación del número de LDs por mg de peso fresco. E) Imágenes de microscopía óptica de las fracciones de LDs obtenidas a partir de hojas de plantas senescentes e infectadas y tñidas con BODIPY<sup>493/503</sup>. Barra = 20 μm. Detalle mostrando morfología de un LD mediante microscopía confocal. Barra = 2 μm.

El procesamiento de las muestras y las condiciones utilizadas para su análisis en el citómetro de flujo nos permitieron además, hacer una estimación del número de cuerpos lipídicos obtenidos en cada tipo de muestra en relación a la cantidad de tejido utilizado para su purificación (Figura 10D). Finalmente y como confirmación de los resultados descritos, alícuotas de LDs de cada una de las fracciones purificadas se tiñeron con BODIPY y se visualizaron al microscopio óptico. En la figura se muestra un ejemplo representativo de cada una de las muestras en la que se aprecia que existe una buena correlación entre el aspecto y el número de LDs observados y los resultados obtenidos en el análisis de estas fracciones mediante citometría de flujo (Figura 10E).

## Análisis proteómico de los LDs preparados

Una vez establecido un protocolo que rindiese LDs de calidad y en cantidades suficientes, se procedió a realizar un análisis proteómico de las muestras obtenidas a partir de hojas de plantas senescentes de 6 semanas de edad y de plantas jóvenes infectadas durante 24 y 72 h con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1*. A este objeto se realizó una aproximación *shotgun proteomics*, en la que cantidades equivalentes de LDs procedentes de tres réplicas biológicas independientes se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE, para proceder a recortar el gel, digerir las bandas con tripsina y recoger los péptidos correspondientes. Las muestras obtenidas fueron sometidas a análisis mediante espectrometría de masas (MS) (Figura 11A) y los datos obtenidos se emplearon para la identificación de las proteínas correspondientes, empleando la base de datos de UniProt de *Arabidopsis thaliana*, que en el momento de su consulta contenía un total de 31478 entradas. Para la generación de los datos crudos, se contabilizaron las proteínas detectadas con una puntuación MASCOT igual o superior a 30, de manera que se obtuvo una lista de entre 300 y 600 proteínas en las distintas muestras y réplicas examinadas (Tabla II). En un análisis inicial se observó que una gran parte de las entradas presentes en los datos crudos eran redundantes, y correspondían a duplicidades en la base de datos. Igualmente, la existencia de diferentes isoformas en una misma familia de proteínas o de proteínas homólogas con un alto grado de similitud, provocaba que un mismo péptido fuera asignado a más de una proteína. La eliminación de proteínas redundantes ocasionó una reducción en el conjunto del proteoma a una cantidad de entre 200 y 400 componentes (Tabla II). A continuación, y con objeto de otorgar mayor consistencia y fiabilidad a los datos, así como de eliminar posibles componentes

minoritarios que pudieran ser debidos a contaminaciones del proceso, se eliminaron aquellas proteínas representadas por un único péptido, lo que redujo el número de proteínas a una lista de entre 100 y 200, según las muestras. Una vez realizado el filtrado de los datos obtenidos para cada réplica, y con el objetivo de establecer un proteoma fiable para cada condición, se seleccionaron aquellas proteínas que estaban presentes en las tres réplicas biológicas examinadas en cada condición. De esta manera se generaron los proteomas definitivos con los que se han realizado los análisis posteriores. Así, el proteoma de los LDs procedentes de hojas senescentes se redujo a 72 proteínas, mientras que los proteomas de los LDs preparados a partir de tejidos infectados durante 24 y 72 h estaban compuestos por un total de 70 y 81 proteínas, respectivamente (Figura 11B). Un resumen del proceso de tratamiento de los datos proteómicos se muestra en la



**Figura 11. Análisis proteómico de fracciones de LDs.** A) Mapa conceptual del análisis proteómico realizado desde la obtención de la fracción de LDs analizada hasta la adquisición de los datos finales. B) Diagramas de Venn mostrando el número de proteínas identificadas en cada una de las 3 réplicas examinadas para cada condición en los que se muestra el número de proteínas que solapan.

Tabla II. Las diferentes listas de proteínas se encuentran disponibles en las tablas del anexo (Tablas S1, S2 y S3).

**Tabla II.** Proceso de filtrado de los datos brutos obtenidos del análisis proteómico de muestras de LDs hasta obtener los proteomas definitivos.

| Proceso   | Hojas senescentes |     |     | <i>Pst DC3000 avrRpm1</i> |     |     |           |     |     |
|---|-------------------|-----|-----|---------------------------|-----|-----|-----------|-----|-----|
|   |                   |     |     | 24 hpi                    |     |     | 72hpi     |     |     |
|   | R1                | R2  | R3  | R1                        | R2  | R3  | R1        | R2  | R3  |
| Proteínas con puntuación total MASCOT > 30 ( $p < 0,05$ ) | 453               | 547 | 297 | 400                       | 407 | 308 | 493       | 433 | 589 |
| Eliminación de entradas redundantes, homologías...        | 409               | 341 | 222 | 276                       | 292 | 218 | 341       | 316 | 435 |
| Proteínas detectadas con más de un péptido                | 198               | 168 | 117 | 133                       | 146 | 112 | 169       | 135 | 296 |
| <b>Proteínas comunes a las 3 réplicas</b>                 | <b>72</b>         |     |     | <b>80</b>                 |     |     | <b>81</b> |     |     |

## Análisis de los proteomas determinados

El análisis de los proteomas determinados puso de manifiesto que los LDs examinados comparten una parte de sus componentes, mientras que otros son exclusivos de algunos de ellos. Así, un total de 33 proteínas fueron detectadas tanto en muestras procedentes de hojas senescentes, como de hojas infectadas con *Pst DC3000 avrRpm1* a los dos tiempos examinados (Tabla S4). Además, se pueden identificar 12 proteínas que aparecen exclusivas en LDs de hojas senescentes (Tabla S5) y 54 proteínas se encuentran asociadas únicamente a la infección, de las que 16 proteínas aparecen solo a las 24 h de infección, 28 son exclusivas del proteoma correspondiente a las 72 h de la infección, y 7 proteínas están presentes en los proteomas definidos a los dos tiempos de infección (Figura 12A, Tabla S6).

Con objeto de analizar la funcionalidad de las proteínas identificadas y vincular a los LDs con posibles procesos biológicos en los que pudieran hallarse implicados, se procedió a analizar las categorías de *Gene Ontology* (GO) de los proteomas obtenidos. Estos análisis permitieron determinar que, los diferentes proteomas de LDs obtenidos en este trabajo reflejaban un enriquecimiento en proteínas implicadas en respuestas a estrés de tipo biótico y abiótico (~15%) y en procesos de transporte (12-17%) en comparación a los valores correspondientes al proteoma completo de *Arabidopsis* (con un 5,6% y un

4,3%, de representación en funciones relacionadas con el estrés biótico y abiótico, y el transporte, respectivamente). En su conjunto, los términos asignados a las categorías “respuesta a estímulos biótico y abiótico”, “respuesta a estrés” y “transporte”, constituyen entre el 25-30% del proteoma de los LDs, lo que sugiere la participación de estos orgánulos en dichos procesos biológicos (Tabla III). Cabe mencionar además, el enriquecimiento (desde 0,5% en el proteoma de *Arabidopsis* al 1-4% en los proteomas de LDs) en términos asignados a la categoría de “transporte de electrones o rutas energéticas”, cuyo significado es desconocido por el momento y del que no podemos excluir que pueda estar relacionados con proteínas procedentes de los cloroplastos y/o ser proteínas contaminantes en nuestros proteomas.

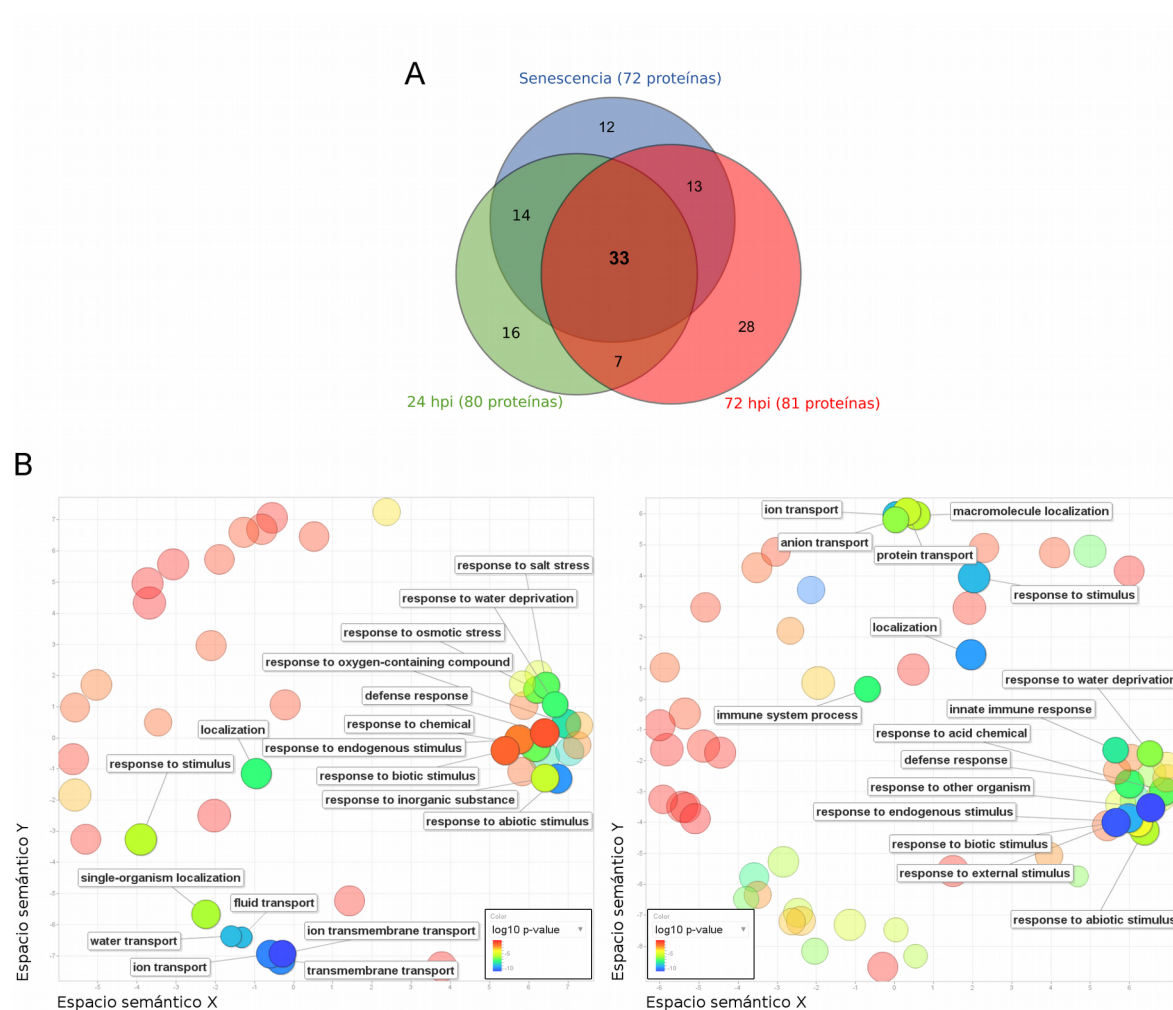
En el análisis de las proteínas comunes a los tres proteomas (un total de 33 proteínas) y proteínas exclusivas de los proteomas obtenidos en condiciones de infección por la bacteria (51 proteínas), se obtuvieron resultados similares a los descritos anteriormente, mostrándose de nuevo un enriquecimiento en procesos de respuesta a

**Tabla III.** Análisis de los diferentes proteomas de LD obtenidos para términos de Ontología Génica (GO) relacionados con Procesos Biológicos. Se indican los porcentajes de proteínas relacionadas con cada proceso biológico en cada proteoma y en el proteoma de *Arabidopsis*.

| Proceso biológico                               | Genoma completo | Proteoma de LD    |   |        |
|---|-----------------|-------------------|---|--------|
|   |                 | Hojas senescentes | Hojas infectadas <i>Pst</i> DC3000 <i>avrRpm1</i> |        |
|   |                 |                   | 24 hpi  | 72 hpi |
| Organización celular y biogénesis               | 3,8%            | 3,3%              | 4,2%  | 3,3%   |
| Procesos del desarrollo                         | 5,3%            | 1,6%              | 1,6%  | 2,0%   |
| Metabolismo de DNA o RNA                        | 1,1%            | 0%                | 0%  | 0%     |
| Rutas energéticas o de transporte de electrones | 0,5%            | 4,5%              | 3,4%  | 1,1%   |
| Otros procesos biológicos                       | 5,0%            | 5,4%              | 6,4%  | 6,6%   |
| Otros procesos celulares                        | 24,8%           | 20,6%             | 21,3%   | 17,9%  |
| Otros procesos metabólicos                      | 20,7%           | 18,3%             | 18,1%   | 14,5%  |
| Metabolismo de proteínas                        | 6,3%            | 4,7%              | 3,2%  | 2,9%   |
| Respuesta a estímulos bióticos o abióticos      | 5,6%            | 14,8%             | 14,7%   | 15,8%  |
| Respuesta a estrés                              | 6,1%            | 11,3%             | 12,9%   | 15,8%  |
| Transducción de señales                         | 2,6%            | 0,6%              | 0,8%  | 0,9%   |
| Transcripción dependiente de DNA                | 5,0%            | 0,4%              | 0,4%  | 0,4%   |
| Transporte                                      | 4,3%            | 13,8%             | 12,7%   | 17,7%  |
| Procesos biológicos desconocidos                | 9,0%            | 1,0%              | 0,4%  | 0,9%   |

estrés y estímulos, así como transporte. Se observa además, una reducción en cuanto a términos englobados dentro de la categoría “rutas energéticas o de transporte de electrones” (Figura 12).

A diferencia de las categorías mencionadas hasta el momento, en los proteomas examinados se detecta una reducción en la representación de términos relacionados con



**Figura 12. Proteínas comunes en los LDs obtenidos en las diferentes condiciones analizadas.** A) Diagramas de Venn mostrando el número total de proteínas obtenidas en cada proteoma y el número de proteínas solapantes para las 3 condiciones analizadas. B) Enriquecimiento en términos de GO de las proteínas comunes a los 3 proteomas identificados y de las proteínas detectadas exclusivamente en los LDs generados en respuesta a la infección con *Pst* DC3000 *avrRpm1*. Los p-valor y las categorías GO fueron obtenidos mediante AgriGO v2.0 y representados gráficamente en un espacio de dos dimensiones que resume las similitudes semánticas para las categorías de GO. El principio subyacente es que términos semánticamente similares de categorías de GO deberían permanecer cercanos en el gráfico. Las unidades del espacio semántico no tienen un significado intrínseco. El color de las burbujas indica el  $\log_{10}$  del p-valor; el tamaño de los círculos indica la frecuencia con la que la categoría de GO aparece en la base de datos subyacente (las burbujas de términos generales son más grandes).

“procesos del desarrollo”, “metabolismo de DNA o RNA”, “transducción de señales” y “transcripción DNA-dependiente”, lo que, de acuerdo a los componentes identificados en otros proteomas de LDs, indica que estos orgánulos no participan en este tipo de procesos. Cabe mencionar, sin embargo, que en los núcleos de células de mamíferos (Layerenza et al., 2013; Uzbekov y Roingeard, 2013) se ha observado la formación de LDs, designados como LDs nucleares, que podrían regular el metabolismo lipídico del núcleo, así como LDs citosólicos en células de mamífero capaces de reclutar factores de transcripción, enzimas y componentes de la cromatina, controlando su disponibilidad en el núcleo, y actuando en procesos relacionados con la función nuclear (Welte y Gould, 2017).

## Comparación con otros proteomas

Para complementar el análisis de los proteomas obtenidos y puesto que aparecen proteínas relacionadas con la membrana, vesículas y otros orgánulos celulares se realizó un estudio comparativo con otros proteomas de interés con objeto de determinar el posible solapamiento entre ellos (Tabla IV). En estos análisis se incluyeron los proteomas procedentes de LDs de semillas y tejidos vegetativos (Jolivet et al., 2004; Vermachova et al., 2011; Brocard et al., 2017), varios proteomas de LDs presentes en los cloroplastos, denominados plastoglóbulos (Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012a), así como un grupo de proteínas candidatas a formar parte de LDs de hojas senescentes obtenidas mediante inmunoprecipitación de la proteína CLO3 identificada en LDs (Shimada et al., 2014). Igualmente se examinó la correspondencia entre los proteomas identificados en nuestro estudio y los correspondientes a otro tipo de estructuras y orgánulos celulares tales como el retículo endoplásmico (Dunkley et al., 2006; Nikolovski et al., 2012), la membrana plasmática (Alexandersson et al., 2004; Marmagne et al., 2004), el tonoplasto y la red Trans-Golgi, endosomas tempranos (Heard et al., 2015) y vesículas extracelulares (Rutter y Innes, 2017).

La comparación de nuestros proteomas con el grupo de proteínas obtenidas mediante inmunoprecipitación de la proteína de fusión CLO3:GFP, puso de manifiesto un alto nivel de solapamiento de entre el 50 y el 65% del total. Igualmente, cabe resaltar el alto nivel de conservación entre las proteínas de los LDs y las detectadas en el proteoma de un grupo de vesículas localizadas en los espacios extracelulares de plantas de



*Arabidopsis* y cuya función podría estar relacionada con la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de patógenos y/o con el transporte de proteínas entre distintos órganos de la planta (Rutter y Innes, 2017).

Por otro lado, pudimos comprobar que las coincidencias entre los proteomas determinados en nuestro estudio y el proteoma de LDs de hojas senescentes determinados por el grupo de Brocard et al., (2017) se reduce a un número muy pequeño de proteínas (entre el 4% y 6% del total). Es posible que el bajo nivel de solapamiento entre estos proteomas sea consecuencia de las condiciones de crecimiento de las plantas empleadas para la obtención de los LDs. Así, mientras que en nuestro trabajo las plantas senescentes crecen en alvéolos independientes y no presentan pérdida de clorofila, en el trabajo publicado por Brocard et al., las plantas presentan un fuerte amarilleamiento y un aspecto estresado debido, posiblemente, a la alta densidad en la que crecen las plantas hasta alcanzar la senescencia.

Como cabía esperar no se detectaron coincidencias entre los proteomas definidos en este estudio y los correspondientes a los LDs de semillas. Igualmente, la comparación con los proteomas de plastoglóbulos, presentó un nivel de solapamiento muy bajo. En este último caso, sólo uno de los proteomas escogidos muestra alguna coincidencia con

**Tabla IV.** Comparación de los proteomas de LD con otros proteomas publicados. Los proteomas preliminares de LD y otros orgánulos o estructuras celulares fueron analizados. Se muestra el porcentaje de solapamiento de proteínas.

| Proteoma                             | Hojas senescentes | <i>Pst DC3000 avrRpm1</i> |                   | Publicación                                   |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---|
|                                      |                   | 24 hpi                    | 72hpi             |   |
| Cuerpos lipídicos                    | 4,2%              | 5,7%                      | 6,2%              | Brocard et al., 2017                          |
| CLO3-GFP inmunoprecipitación         | 65,3%             | 55,7%                     | 51,9%             | Shimada et al., 2014                          |
| Cuerpos lipídicos de semillas        | Sin coincidencias | Sin coincidencias         | Sin coincidencias | Jolivet et al., 2004; Vermachova et al., 2011 |
| Plastoglóbulos                       | 2,8%              | 2,9%                      | 2,5%              | Ytterberg et al., 2006                        |
| Plastoglóbulos                       | Sin coincidencias | Sin coincidencias         | Sin coincidencias | Lundquist et al., 2012                        |
| Retículo endoplásmico                | 11,1%             | 14,3%                     | 17,3%             | Nikolovski et al., 2012                       |
| Retículo endoplásmico                | 6,9%              | 14,3%                     | 14,8%             | Dunkley et al., 2006                          |
| Membrana plasmática                  | 34,7%             | 30%                       | 38,3%             | Alexandersson et al., 2004                    |
| Membrana plasmática                  | 18,1%             | 18,6%                     | 19,8%             | Marmagne et al., 2004                         |
| Tonoplasto                           | 8,3%              | 12,9%                     | 7,4%              | Heard et al., 2015                            |
| Vesículas extracelulares             | 33,3%             | 25,7%                     | 29,6%             | Rutter & Innes, 2016                          |
| Red Trans-Golgi/vesículas secretoras | 5,6%              | 4,3%                      | 4,9%              | Heard et al., 2015                            |

nuestros proteomas, que en cualquier caso es inferior al 3%, limitándose a las proteínas Rubisco Activasa (RCA) y a la subunidad grande de la Rubisco (RBCL).

De particular interés resulta la comparación de nuestros proteomas con proteomas del retículo endoplásmico, a partir de cuya estructura original se originan los LDs y con la que los LDs mantienen una continuidad (ER-LDs). En función del proteoma empleado en nuestra comparación, el porcentaje de proteínas comunes oscila entre el 7 y el 17%. Un porcentaje mayor de coincidencias se encontró al comparar nuestros proteomas con los correspondientes a proteomas de membrana plasmática (18-20% en el caso del proteoma publicado por Marmagne et al., (2004) y de un 30-38% con el publicado por Alexandersson et al., (2004). Finalmente, cabe mencionar que el proteoma del tonoplasto, presenta un nivel de coincidencias del 7 al 13%, mientras que el porcentaje de solapamiento con las proteínas de la red Trans-Golgi (TGN) fue de alrededor del 5%.

Los resultados de estos análisis indican, que al igual que se ha descrito en otros organismos, los proteomas de los LDs contienen proteínas procedentes de otras estructuras celulares tales como el retículo endoplásmico y la membrana plasmática. Estos resultados apoyan la participación de los LDs en el tráfico intracelular, aunque esta hipótesis debe ser examinada en mayor detalle procediendo a confirmar la localización de las proteínas identificadas en los LDs, así como su liberación posterior a otras estructuras celulares.

## Análisis de proteínas identificadas

El análisis de las proteínas presentes en los LDs aislados en este trabajo permite comprobar la presencia de proteínas previamente caracterizadas como componentes de LDs de plantas, así como nuevas proteínas no asociadas anteriormente con estos orgánulos. Algunas de estas últimas (no descritas anteriormente en plantas) han sido asociadas a LDs en otros organismos.

Entre las proteínas identificadas en los tres proteomas caracterizados se encuentran las proteínas CLO3 (Caleosina 3) y LDAP1 (*LD-associated protein 1*), descritas previamente como componentes de LDs de tejidos vegetativos (Aubert et al., 2010; Shimada et al., 2014; Gidda et al., 2016; Brocard et al., 2017). Igualmente, los tres proteomas identificados contienen enzimas relacionados con el metabolismo de lípidos tales como GAPA (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y GPAT4 (Glicerol-3-fosfato

aciltransferasa 4) que participan en la síntesis de TAGs y de monómeros de cutina (Li-Beisson et al., 2001; Li et al., 2007). En este caso y aunque estas proteínas no habían sido previamente detectadas en LDs de plantas, su presencia en LDs había sido descrita en algas y organismos tales como mamíferos y *Drosophila* (Nguyen et al., 2011; Wilfling et al., 2013; Goold et al., 2015).

La proteína PUX10 (AT4G10790; *UBX domain-containing protein*), de función desconocida, aparece de forma mayoritaria en los tres proteomas caracterizados. Esta proteína, que contiene un dominio UBX, parece localizarse en la membrana plasmática de *Arabidopsis* (Nikolovski et al., 2012), y no había sido descrita anteriormente como componente de LDs en plantas. Sin embargo, proteínas homólogas con dominios UBX tales como las proteínas UBX2 y UBXD8, caracterizadas en levaduras y mamíferos, respectivamente, forman parte de los LDs de estos organismos (Fujimoto et al., 2004; Schuberth y Buchberger, 2008; Suzuki et al., 2012; Wang y Lee, 2012). La proteína UBX2 de levaduras participa en la regulación de la homeostasis de los LDs y en la incorporación de proteínas en estos orgánulos desde el retículo endoplásmico (Wang y Lee, 2012; Ruggiano et al., 2016). Igualmente, la proteína UBXD8 se localiza en los LDs y en la membrana del ER y forma parte del complejo proteico que regula la degradación de proteínas en el ER (Mueller et al., 2008), así como el metabolismo de lípidos, bloqueando la conversión de DAG en TAG en células sometidas a restricción de ácidos grasos (Lee et al., 2010).

Finalmente, y como componente común a los tres proteomas examinados, cabe mencionar la presencia de la proteína Flotillin-1 (FLOT1) que ha sido localizada en la membrana plasmática, asociada a dominios lipídicos denominados “*lipid rafts*” (Browman et al., 2007). Al igual que en los casos anteriores, además de en la membrana plasmática, la proteína FLOT1 se ha localizado en LDs de células de mamíferos desde donde pueden dirigirse a otros compartimentos o estructuras celulares (Browman et al., 2007).

Dentro del grupo de proteínas identificadas en los LDs aislados a partir de hojas infectadas cabe destacar la presencia de las proteínas  $\alpha$ -DOX1, LDAP3 (*LD-associated protein 3*) y ULP/LDIP (*Unknown Lipid Droplet protein/LDAP interacting protein*, previamente identificada en LDs de plantas de *Arabidopsis* (Gidda et al., 2016; Brocard et al., 2017; Pyc et al., 2017a). Igualmente, entre las proteínas relacionadas con la infección se encuentran la proteína Aldehído deshidrogenasa 3F1 (ALDH3F1), que participa en el metabolismo de oxilipinas y podría actuar sobre los productos enzimáticos de las

proteínas  $\alpha$ -DOX1 (Stiti et al., 2011), y las enzimas CYP71A12, CYP71A13 y PAD3 (*Phytoalexin Deficient 3*) que forman parte de la ruta de síntesis de la fitoalexina camalexina, que tiene actividad antimicrobiana.

Además, en los LDs de tejidos infectados se detecta la presencia de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos tales como las enzimas Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, GAPA, GAPB y GPAC, GPAT8 (Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 8) y CER10 que participan en la síntesis de TAGs y de componentes de la cutina (Li-Beisson et al., 2001; Zheng et al., 2005; Li et al., 2007).

Finalmente, en los proteomas de LDs procedentes de hojas infectadas, cabe destacar la identificación de proteínas cuya presencia en la célula está regulada por ABA, como es el caso de las proteínas ABCG40 (*ATP binding cassette 40*), ERD7 (*Early responsive to deshydration 7*), ELI3-2 (*Elicitor activated gene 3-2*), y de las proteínas Rab RAB1A, RAB7B, RAB2C, RAB18 y RAB21A. La función de las proteínas Rab ha sido relacionada con el tráfico de vesículas en el interior de la célula (Rutherford y Moore, 2002; Saito y Ueda, 2009) y, aunque no habían sido detectadas en los LDs de plantas con anterioridad, se ha descrito la localización de proteínas homólogas en LDs de células de mamíferos en donde participan en procesos de tráfico intracelular (Li y Yu, 2016; Li et al., 2017; Zappa et al., 2017).

Además de las proteínas descritas, los proteomas caracterizados contienen proteínas pertenecientes a la membrana plasmática. En este grupo cabe mencionar a las proteínas PIP2a, PIP1;5 y PIP3 (*Plasma membrane intrinsic protein*) que actúan como canales para facilitar la difusión de agua y otros solutos no cargados a través de la membrana, Remorin, PEN3 (*Penetration 3*), SYT (*Synaptotagmin*), SYP (*Syntaxin 1*), HIR1 (*Hypersensitive Induced Reaction 1*), HIR2 o HIR4. Estas proteínas, al igual que FLOT1, se encuentran localizadas en microdominios de membrana, en los que la composición de lípidos difiere de otras regiones (Qi y Katagiri, 2012; Malinsky et al., 2013). La presencia de estas proteínas en los LDs apoya la participación de estos orgánulos en el tráfico celular y sugiere que al menos una parte de los LDs podrían interaccionar con dominios de membrana específicos que participan en procesos relacionados con la activación de la defensa de las plantas.

Finalmente es importante mencionar que una parte de las proteínas identificadas podrían no ser proteínas componentes de LDs, si no proteínas que debido a su abundancia en los tejidos vegetales, habrían sido arrastradas durante el proceso de

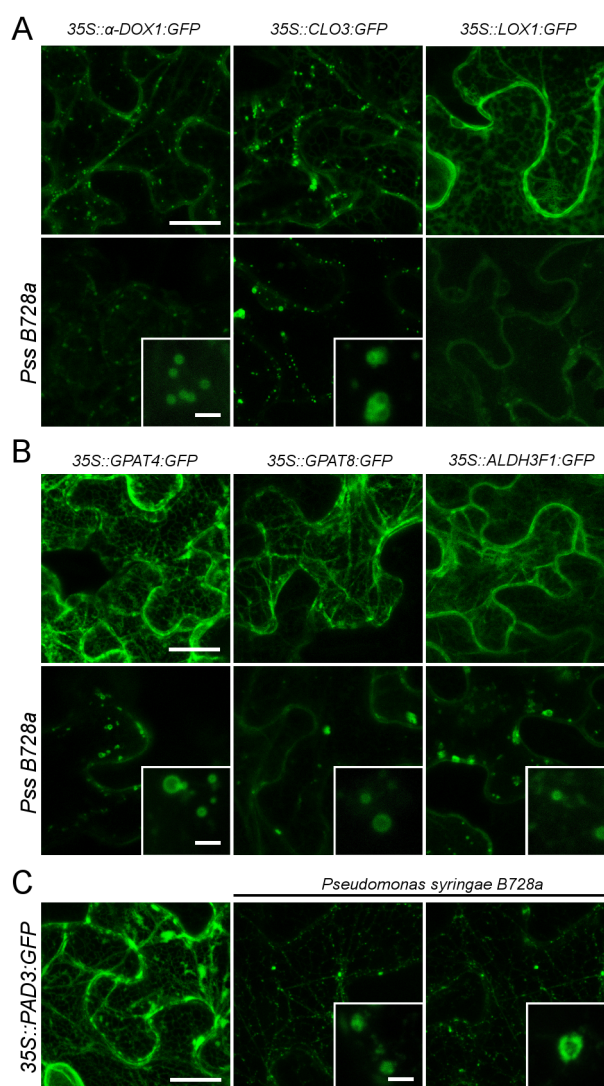
purificación. Tal es el caso de las proteínas relacionadas con el proceso de fotosíntesis tales como RBLC (Subunidad grande de la Rubisco), RCA (Rubisco Activasa) y proteínas que forman parte de los centros de reacción de los fotosistemas (PSBC, PSAF, PSBb, LHCB4.1, LHCB5, PSAD-1, PSAB, LHCB6, LHCB2.2, PSAA). Esto podría ocurrir igualmente con algunas de las proteínas descritas anteriormente, por lo que su presencia como parte de los LDs necesita ser validada.

## Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Con objeto de confirmar los datos proteómicos obtenidos en nuestro trabajo, nos propusimos examinar la localización celular de algunos de los componentes proteicos identificados en los LDs, realizando para ello ensayos de expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana*. En estos ensayos se generaron construcciones quimera en las regiones codificadoras de las proteínas de interés que se fusionaron en fase al gen marcador GFP y se expresaron bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Las proteínas elegidas para verificar su localización fueron las aciltransferasas GPAT4 y GPAT8 implicadas en la síntesis de cutícula (Li et al., 2007), la proteína adehído deshidrogenasa ALDH3F1, candidata a catalizar la oxidación de los productos derivados de la actividad  $\alpha$ -DOX1 (Stiti et al., 2011), y la proteína PAD3 que cataliza una reacción clave en la síntesis de camalexina (Schuhegger et al., 2006). Además, y como proteínas control cuya localización había sido descrita previamente en los LDs, se examinaron las proteínas CLO3 y  $\alpha$ -DOX1. Igualmente, en estos análisis examinamos la localización de la proteína LOX1 que establece una interacción metabólica con las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3, pero que no formaba parte de los proteomas definidos en nuestro trabajo. La infiltración con las cepas de *Agrobacterium* conteniendo las construcciones descritas permitió detectar la fluorescencia derivada de la expresión de las proteínas de fusión en la membrana plasmática de las células examinadas. En el caso de las proteínas CLO3:GFP, GPAT4:GFP y LOX1:GFP (Figura 13A y 13B) era posible detectar también fluorescencia en el ER de la célula. Además, y de interés para nuestros estudios, las proteínas CLO3:GFP y la  $\alpha$ -DOX1:GFP aparecían localizadas en LDs (Figura 13A).

La distribución de la fluorescencia asociada a la expresión de las proteínas de fusión preparadas variaba cuando junto a las cepas de *Agrobacterium* (conteniendo las

construcciones de interés), procedimos a coinfiltrar la bacteria *Pseudomonas syringae* B728a, inductora de una respuesta hipersensible de defensa (Figura 13). La utilización de concentraciones bajas de esta bacteria ( $10^4$  ufc/mL), nos permitió examinar el posible cambio de localización de las proteínas examinadas como consecuencia de la formación de LDs que ocurre en respuesta a la infección bacteriana. La observación de tejidos co-



**Figura 13. Localización de proteínas de fusión fluorescentes en hojas de *Nicotiana benthamiana*.** Se muestran las imágenes correspondientes a la localización de las proteínas de interés en hojas inoculadas con las cepas de *Agrobacterium* conteniendo las construcciones generadas, así como en hojas inoculadas además con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. Barra = 20 μm; Barra detalle = 2 μm.

infiltrados puso de manifiesto una reducción generalizada en la intensidad de la fluorescencia asociada a todas las construcciones examinadas. En el caso de las construcciones GPAT4:GFP, GPAT8:GFP, ALDH3F1:GFP la inducción de la reacción hipersensible permitió observar la formación de orgánulos fluorescentes de un tamaño generalmente no superior a 1,5  $\mu\text{m}$ , que corresponderían a LDs. En el caso de construcciones CLO3:GFP y  $\alpha$ -DOX1:GFP la formación de LDs fluorescentes se hizo más aparente en comparación con la observada en las hojas infiltradas exclusivamente con la cepa de *Agrobacterium*. A diferencia de los resultados descritos, y de acuerdo con los datos del análisis proteómico, la proteína LOX1:GFP no formaba parte de LDs en ninguna de las muestras examinadas, independientemente de que la infiltración se realizara solo con *Agrobacterium* o con las cepas bacterianas *Agrobacterium* y *Pseudomonas*.

Los resultados de estos análisis permitieron validar los resultados del análisis proteómico realizado en este trabajo y confirmar la presencia de las proteínas GPAT4, GPAT8, ALDH3F1, CLO3 y  $\alpha$ -DOX1:GFP en LDs.

Una situación distinta y que requiere un estudio adicional se refiere a los resultados obtenidos en el análisis de la proteína PAD3:GFP, en la que la coinoculación de las bacterias *Agrobacterium* y *Pseudomonas* permitió observar la presencia de la proteína PAD3:GFP en pequeños dominios de aspecto vesicular localizados en el ER de la célula que no llegan a formar LDs (Figura 13C). Desconocemos, por el momento, si la localización observada podría variar de acuerdo al nivel de expresión de la proteína PAD3:GFP o al tiempo en el que se realiza el análisis, sin embargo, los resultados obtenidos no nos permiten confirmar la presencia de esta proteína en LDs. La localización de la proteína PAD3 así como del resto de las proteínas examinadas, se determinará en más detalle tras la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con sobreexpresión de las proteínas de fusión de interés.

## Análisis de dominios transmembrana *in silico*

Una de las preguntas recurrentes en cuanto a la biología de los LDs es cómo los componentes proteicos de estos orgánulos se incorporan y se disponen en ellos. Igualmente, esta cuestión es importante para determinar el grado de interacción de las proteínas con estos orgánulos. La ultraestructura de los LDs impone restricciones biofísicas al tipo de dominios proteicos que pueden asociarse con ellos (Bersuker y

Olzmann, 2017). El núcleo de lípidos neutros de los LDs no favorece la presencia de dominios hidrofílicos, por lo que aparentemente se encuentra libre de proteínas, que se localizan principalmente en la monocapa de fosfolípidos que rodea al núcleo (Bersuker y Olzmann, 2017). En función de la ruta seguida por las proteínas para incorporarse a los LDs, se pueden distinguir dos clases de proteínas: aquellas que se incorporan a partir del ER (clase I) y aquellas que lo hacen a través del citosol (clase II) (Kory et al., 2016).

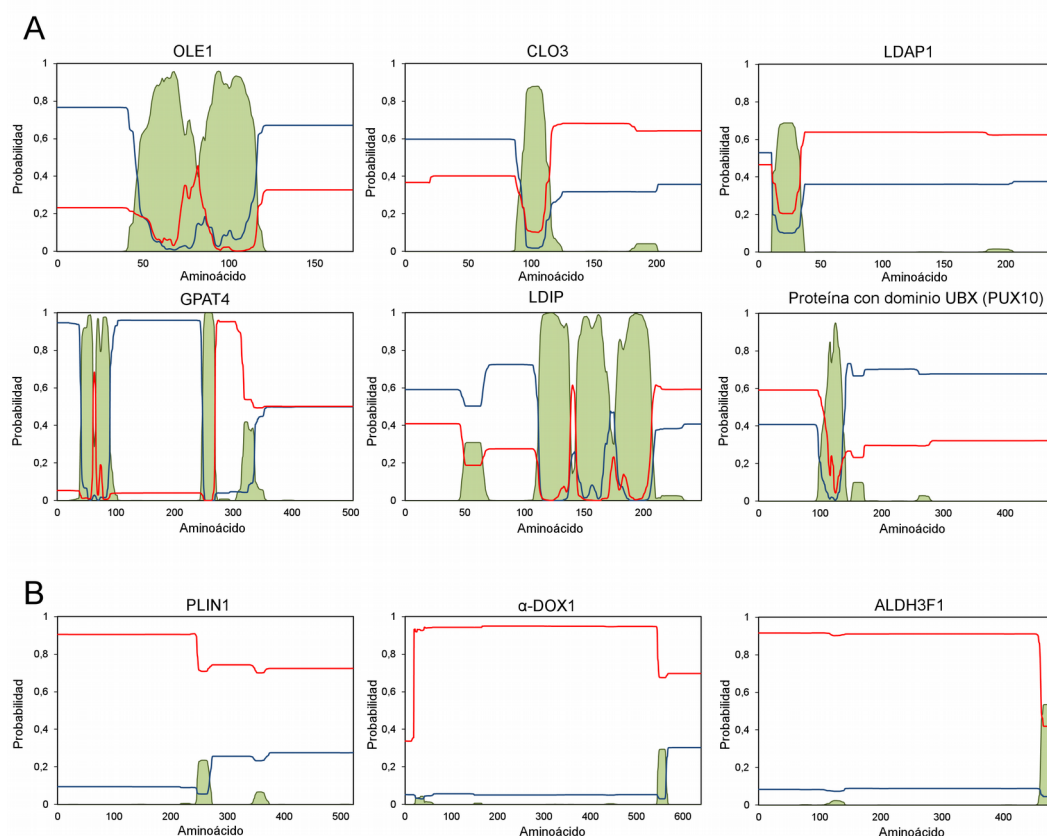
Las proteínas de clase I se encuentran inicialmente insertadas en la membrana del ER, y se relocalizan posteriormente desde el ER a los LD empleando la continuidad física entre estos dos tipos de orgánulos. En ausencia de LDs, estas proteínas se encuentran embebidas en la bicapa del ER y se traslocan a los LDs durante su formación a través de conexiones con los LDs existentes. Dentro de esta clase cabe mencionar a las proteínas UBXD8 y GPAT4 de mamíferos y a las oleosinas de plantas (Kory et al., 2016). Una característica habitual de estas proteínas es la presencia de varios residuos de prolina en la región hidrofóbica conocida como *proline-knot*. La mutación de esta región en el caso de las oleosinas no afecta a la topología de estas proteínas en ER, pero sí a su localización en los LDs (Abell et al., 1997), aunque la presencia de este motivo no parece ser un requerimiento necesario para la localización de las proteínas de clase I en los LDs.

Las proteínas de clase II, se traducen en el citoplasma, desde donde se unen posteriormente a la superficie de los LDs. Estas proteínas contienen normalmente secuencias con tendencia a formar hélices anfipáticas o fragmentos cortos de residuos hidrofóbicos necesarios para la unión a los LDs. A este grupo pertenecen las perilipinas de mamíferos (Kory et al., 2016). Se desconoce el mecanismo que conduce a estas proteínas hasta los LDs, aunque estos dominios podrían tener la capacidad de “detectar” determinadas propiedades de la membrana de LDs.

Con objeto de examinar a qué tipo de componentes de los LDs corresponden las proteínas identificadas en este trabajo, así como de establecer su posible relación con los mecanismos de transporte a estos orgánulos, se procedió a analizar los dominios transmembrana y la capacidad de estas proteínas para adoptar una conformación de  $\alpha$ -hélice en un ambiente predominantemente hidrofóbico. Para ello y tomando como referencia algunas de las proteínas previamente caracterizadas en relación a su localización en los LDs, tales como OLE1, CLO3, LDAP y PLIN1 (perilipina de humanos), se analizaron las secuencias correspondientes a las proteínas  $\alpha$ -DOX1, GPAT4, GPAT8, ALDH3F1, PUX10 y LDIP. Las proteínas OLE1 y CLO3 presentan regiones bien definidas



de alta hidrofobicidad (Figura 14A) y la presencia del *proline-knot* que participaría en su anclaje a los LDs, probablemente mediante la generación de horquillas (Abell et al., 1997). Al igual que éstas, la proteína LDIP muestra varias regiones transmembrana que indican que su localización en LD podría originarse a partir del ER, y que serían clasificadas como proteínas de tipo I (Figura 14A). En este mismo grupo estarían englobadas las proteínas GPAT4 y GPAT8 que presentan también varias regiones transmembrana (Figura 14A) y cuya localización en el retículo está bien documentada. La proteína LDAP muestra también una región que probablemente fijaría la proteína al núcleo de los LDs, de manera similar a lo que ocurriría con la proteína PUX10 (Figura 14A), aunque en este caso no queda muy claro, por lo que su clasificación en clase I o II no puede ser asignada. Por otro lado, las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y ALDH3F, contienen



**Figura 14. Análisis *in silico* de los dominios transmembrana presentes en las proteínas de los LDs.** La presencia de segmentos transmembrana en las proteína seleccionadas se determinó mediante el método de predicción del software Phobius. Se representa en verde: los dominios transmembrana; en rojo: las regiones no citoplasmáticas; en azul: regiones citoplasmáticas. El eje x representa los residuos aminoacídicos y el eje y la probabilidad de que los aminoácidos en ese lugar ocupen la región determinada. A) Proteínas de clase I B) Proteínas de clase II.

secuencias de menor hidrofobicidad que probablemente no formen horquillas ni regiones transmembrana (Figura 14B). No obstante, estas secuencias hidrofóbicas podrían ser claves para su localización en LD de manera más superficial, similar a como sucede en las perilipinas de mamíferos (PLIN1). Esto sugiere que estas proteínas quedarían catalogadas dentro de la clase II. Es probable entonces que su traducción tuviera lugar en el citosol y sean traslocadas hacia los LDs por algún mecanismo desconocido.

# Discusión

## Discusión

Los trabajos realizados con objeto de examinar la formación de cuerpos lipídicos en los tejidos vegetativos de la planta habían puesto de manifiesto la presencia en estos orgánulos de los enzimas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3, involucrados en la síntesis de oxilipinas. Ambas proteínas se localizan en LDs formados en hojas senescentes, así como durante la respuesta a la infección del hongo *Colletotrichum higginsianum*, en donde la actividad coordinada de ambos enzimas daría lugar a la producción de 2-HOT (Shimada et al., 2014). Dado nuestro interés en el estudio de los enzimas  $\alpha$ -DOX y en su papel como oxigenasas de ácidos grasos iniciando la síntesis de oxilipinas, nos propusimos examinar la formación de LDs en respuesta a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1* y durante la senescencia de la planta. La selección de estos procesos se basaba en resultados anteriores en los que observamos que la expresión del gen  $\alpha$ -DOX1 se induce en plantas en respuesta a la infección por patógenos biotrofos, alcanzando altos niveles de actividad durante la inducción de la reacción hipersensible (HR) de defensa vegetal (De León et al., 2002; Hamberg et al., 2003). Igualmente, la caracterización de los genes  $\alpha$ -DOX había puesto de manifiesto la inducción de su expresión durante el proceso de senescencia (Obregón et al., 2001; Bannenberg et al., 2009b). De la misma manera, la caracterización de un segundo gen,  $\alpha$ -DOX2, en plantas de tomate, indicaba que su mutación provocaba importantes alteraciones fenotípicas y que por tanto, estos enzimas participaban también en el desarrollo de la planta (Bannenberg et al., 2009b).

El interés en el estudio de los LDs y de su función ha aumentando considerablemente en los últimos años debido a los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación, en los que se pone de manifiesto que estos orgánulos están presentes en diversos tejidos y células de la planta, y que su formación se induce en respuesta a distintas condiciones de estrés. Estos resultados han ampliado nuestra visión acerca de la función de los LDs para los que se proponía un papel pasivo como reservorios de lípidos en las semillas utilizados como fuente de energía durante la germinación (Welte, 2015). Los trabajos recientes nos han proporcionado nuevos datos acerca de la estructura, biogénesis y función de los LDs (Chapman et al., 2012; Murphy, 2012; Walther et al., 2017). Además, el desarrollo de nuevos métodos de purificación ha permitido obtener cantidades suficientes de LDs para realizar el análisis de estos

orgánulos e identificar nuevas proteínas de interés cuya caracterización contribuirá a determinar las funciones realizadas por los LDs en los distintos tejidos y condiciones de estrés en los que se forman (Bersuker y Olzmann, 2017).

En un esfuerzo por identificar nuevos componentes en los LDs de hojas que pudieran participar en el metabolismo de oxilipinas y de su papel en la defensa vegetal, nos propusimos en primer lugar examinar la formación de LDs en las condiciones mencionadas anteriormente, en las que habíamos observado la inducción de los enzimas  $\alpha$ -DOX: la senescencia y la respuesta a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*.

El análisis de estos tejidos nos permitió observar la formación progresiva de LDs en las hojas de la planta en donde alcanzaban altos niveles de acumulación en plantas de 6 semanas de crecimiento (Figura 6). La formación de LDs en hojas senescentes se observaba de forma reproducible en los distintos experimentos realizados, por lo que estos tejidos presentaban dos ventajas importantes para iniciar los experimentos dirigidos a obtener y caracterizar la composición de los LDs: por un lado, la formación de LDs no requería la aplicación de ningún tratamiento exógeno, y por otro y en relación también al primero, la cantidad de tejido disponible para proceder a su purificación no era limitante. Se desconocen las señales o condiciones fisiológicas que disparan la formación de LDs en tejidos senescentes, aunque se ha propuesto que podría estar relacionado con un proceso de redistribución (*turnover*) de lípidos que tiene lugar durante esta fase del desarrollo vegetal (Schippers et al., 2015). Durante la senescencia, el nivel de ácidos grasos que existe en las hojas disminuye hasta un 80% (Yang y Ohlrogge, 2009; Troncoso-Ponce et al., 2013), de manera que la síntesis de lípidos se reduce a la vez que aumenta la  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas (Christiansen y Gregersen, 2014). La acumulación de LDs durante esta fase del desarrollo podría ser, por tanto, consecuencia del incremento en el nivel de TAGs procedentes de las membranas celulares que tiene lugar en las hojas senescentes (Kaup et al., 2002; Troncoso-Ponce et al., 2013).

A diferencia de los resultados en los tejidos senescentes, en los que la formación de LDs había sido descrita con anterioridad a este trabajo (Bouvier-Navé et al., 2010; Shimada y Hara-Nishimura, 2015), nuestro estudio representa la primera observación acerca de la formación de LDs durante el proceso de infección con *Pst* DC3000 *avrRpm1*, así como los primeros análisis en los que se ha procedido a purificar y caracterizar estos orgánulos a partir de tejidos sometidos a condiciones de estrés. La formación de LDs

había sido descrita en plantas durante las respuestas a estrés abiótico tales como calor y frío (Gidda et al., 2016), así como al tratamiento por compuestos fúngicos y a la infección de *C. higginsianum* (Coca y San Segundo, 2010; Shimada et al., 2014) aunque en ninguno de los casos descritos se había procedido a realizar la purificación y analizar la composición proteica de estos orgánulos. En nuestro trabajo, la formación de LDs en respuesta a la infección de la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1*, aumenta de forma progresiva a medida que se establece la infección (Figura 7), llegando a alcanzar a las 72 h de infección niveles próximos a los observados en las hojas senescentes (Figura 9C).

Al igual que en la senescencia, se desconocen las señales o procesos celulares que disparan la formación de LDs en respuesta a la infección de patógenos. Es posible que la formación de estos orgánulos sea consecuencia o esté asociada al daño celular que acompaña a la formación de la HR y en general a la formación de síntomas en las hojas infectadas, tanto por la bacteria examinada en este estudio, como por cualquier otro tipo de patógenos. De hecho, la senescencia de la hoja implica también un proceso de daño celular (Lim et al., 2007) que podría compartir con la respuesta a la infección de patógenos, al menos parte de los mecanismos utilizados por las células de la planta para regular este proceso de forma controlada y progresiva. La existencia de un cierto solapamiento entre los programas de senescencia y la respuesta a patógenos ha sido puesto de manifiesto en estudios anteriores (Quirino et al., 1999; Quirino et al., 2000; Robatzek y Somssich, 2002; Lim et al., 2007).

Se sabe, además, que el contenido en ácidos grasos libres en las células aumenta como consecuencia de la infección para permitir la generación de los derivados lipídicos que actúan como moléculas señalizadoras y/o compuestos de defensa. El exceso de ácidos grasos libres podría participar, por tanto, como señal para activar la formación de LDs que podrían jugar funciones diversas en la defensa vegetal.

La acumulación de ácidos grasos en los LDs podría conferir a estos orgánulos un papel antioxidante, tal y como ha sido demostrado en las células de glía de *Drosophila*, en las que los LDs actúan limitando los niveles de ROS (Bailey et al., 2015). Así, los LDs producidos durante la respuesta de las plantas a la infección de patógenos se comportarían como sumideros de ROS para controlar el impacto negativo de estos compuestos, evitando la formación de lesiones (Lamb y Dixon, 1997; Velloso et al., 2010) y aprovechando los efectos beneficiosos asociados a la producción controlada de ROS entre los que se incluyen la muerte directa del patógeno, la activación de la HR o el

reforzamiento de la pared celular (Vellosillo et al., 2010). Los LDs formados durante la infección podrían contribuir, igualmente, a limitar la peroxidación de lípidos asociada a la generación de ROS (Ayala et al., 2014).

La formación de LDs en las respuestas examinadas nos permitió seleccionar los tiempos, las condiciones de crecimiento y los tejidos adecuados para proceder a su purificación. El método establecido en este trabajo ha facilitado el aislamiento de LDs a partir de tejidos vegetativos, tanto a partir de hojas de plantas senescentes, como de hojas procedentes de plantas infectadas con la bacteria *Pst* DC3000 *avrRpm1*. A este objeto hemos utilizado un protocolo que emplea gradientes discontinuos de densidad, basándonos en los utilizados para la obtención de LDs a partir de semillas (Murphy y Cummins, 1989; Tzen et al., 1997). La puesta a punto del protocolo empleado y las pruebas realizadas nos han permitido obtener suficientes LDs sin necesidad de emplear grandes cantidades de tejido como material de partida (Figura 9A). Además, la incorporación de un análisis mediante técnicas de citometría ha posibilitado el examen de la naturaleza y homogeneidad de las muestras preparadas, así como la estimación de la cantidad de LDs purificados a partir de una cantidad dada de tejido. El procedimiento establecido nos ha permitido aislar de forma reproducible LDs a partir de hojas de plantas senescentes de 6 semanas de edad y de plantas de 4 semanas infectadas con *Pst* DC3000 *avrRpm1* a 24 hpi y 72 hpi (Figuras 9 y 11).

El estudio de los LDs formados en células de mamíferos indica la existencia de diferentes subpoblaciones de LDs, que se diferencian entre sí en su tamaño, en su contenido proteico y en la función que realizan (Zhang et al., 2016). En nuestros ensayos, las muestras de LDs purificadas presentan un aspecto y un tamaño homogéneo, aunque no podemos descartar que existan diferencias entre ellas que no sean apreciables en los análisis citométricos realizados. Igualmente, tampoco podemos descartar que dentro de los LDs purificados pudieran existir LDs con distintas características tanto en su composición, como en su función o actividad. De hecho, en las muestras purificadas a partir de hojas de 72 hpi es posible observar una pequeña dispersión en el tamaño de los LDs, aunque no llegan a distinguirse distintas poblaciones con tamaños claramente diferenciados (Figura 10A). Independientemente de estas consideraciones, la citometría de flujo nos ha permitido examinar de forma rápida y reproducible las fracciones de LDs obtenidas en nuestro estudio.

El análisis proteómico de los LDs obtenidos ha permitido determinar el proteoma de estos orgánulos y evaluar su funcionalidad en base a su composición proteica. La comparación de los proteomas caracterizados pone de manifiesto la ausencia de coincidencias con las proteínas presentes en los LDs de las semillas (Jolivet et al., 2004; Vermachova et al., 2011) (Tabla IV) lo que refuerza la idea que propone la diversidad funcional de los LDs generados en distintos tejidos de la planta. Por otro lado, los proteomas definidos en nuestro trabajo comparten entre si un ~50% de su contenido proteico, lo que indica que al menos una parte de las funciones que realizan serían comunes a ambos tipos de LDs (Figura 12A)

En los proteomas caracterizados, la proteína CLO3 aparece con mayor puntuación y número de péptidos que el resto de las proteínas identificadas, lo que posiblemente sea un reflejo de la abundancia y estabilidad, así como de la importancia de esta proteínas en el mantenimiento de la estructura de los LDs. Junto a la proteína CLO3, la proteína LDAP1 aparece como una de las proteínas mayoritarias en los tres proteomas caracterizados en nuestro trabajo. Ambas proteínas, CLO3 y LDAP1, habían sido identificadas anteriormente como las proteínas más abundantes de los LDs de hojas senescentes, en los que llegaban a constituir el 70% de la proteína total de estos orgánulos (Brocard et al., 2017). En este punto cabe resaltar que la comparación de los proteomas correspondientes a los LDs de hojas senescentes en nuestro trabajo y en el trabajo publicado por Brocard et al., (2017) muestra un nivel de solapamiento del 4,2% compartiendo únicamente 3 de las proteínas identificadas (CLO3, LDAP1 y ULP/LDIP) (Tabla IV). Estos resultados contrastan con el hecho de que en ambos estudios se utilizan hojas de plantas senescentes de 6 semanas de desarrollo, sin embargo las plantas utilizadas por Brocard et al., (2017) presentan un aspecto estresado, de coloración amarillenta y rojiza, mientras que en nuestro estudio las plantas no han comenzado a perder clorofila. Estos resultados sugieren que las diferencias en el estado de senescencia de los tejidos examinados pueden provocar diferencias importantes en la composición proteica de los LDs y que estos orgánulos podrían experimentar, por tanto, cambios importantes a lo largo del proceso de senescencia. Esta conclusión podría hacerse extensiva a los LDs que se forman en respuesta a la infección bacteriana cuyas proteínas varían en las muestras de LDs purificadas a las 24 y a las 72 horas de la infección.



Los resultados descritos apoyan la idea generalizada de que los LDs son orgánulos dinámicos cuya composición varía a lo largo de su desarrollo. Por otro lado, la caracterización de los LDs en otros organismos ha demostrado su participación en procesos de transporte de proteínas, así como su interacción con otros orgánulos y estructuras celulares durante la realización de su función (Kohlwein et al., 2013; Gao y Goodman, 2015; Barbosa y Siniossoglou, 2017; Schuldiner y Bohnert, 2017). Esta circunstancia da lugar a que los proteomas identificados en los LDs de distintos organismos contengan proteínas procedentes de otros orgánulos celulares tales como mitocondrias, vacuolas, peroxisomas, etc. (Nguyen et al., 2011). Un ejemplo de esta situación es la proteína SDP1, presente en LDs como consecuencia de la interacción de éstos con los peroxisomas (Eastmond, 2006; Thazar-Poulot et al., 2015). Es por tanto, frecuente, que alguna de las proteínas identificadas en los LDs esté también presente en otros orgánulos y que su localización en la célula varíe de acuerdo a las condiciones examinadas. Esta circunstancia hace imprescindible realizar experimentos adicionales para validar la localización de las proteínas en los LDs, y examinar la dinámica de dichas proteínas entre distintos orgánulos o estructuras celulares.

En este sentido cabe proponer que la identificación en los LDs de componentes de membrana tales como las proteínas PIP (*Plasma membrane Intrinsic Protein*) podría reflejar la participación de estos orgánulos en procesos de tráfico de proteínas. De hecho, la presencia de aquoporinas pertenecientes al tonoplasto (TIP3.2) en los LDs de semillas ha sido documentada (Jolivet et al., 2004). Las proteínas PIP constituyen proteínas integrales de membrana que alcanzan su destino mediante la ruta secretora clásica (ruta anterógrada ER-Golgi) (Hachez et al., 2013; Chevalier y Chaumont, 2015). Estas proteínas se insertan co-traduccionalmente en la membrana del retículo, desde donde son transportadas a la membrana. Se ha propuesto que algunas de las proteínas presentes en el ER podrían ser secretadas a través de puentes ER-LDs, que otorgan a estos orgánulos una continuidad real, y por tanto la posibilidad de intercambiar material (Kory et al., 2016). Diferentes proteínas de la fracción microsomal, como PAD3 (Schuhegger et al., 2006), sintaxinas (SYP121, SYP122), proteínas SNARE (Hachez et al., 2014) y proteínas Rab podrían ser transportadas a través de esta ruta alternativa a la vía de secreción clásica con la intervención de los LDs. Dado el proceso de biogénesis, los LDs podrían desplazarse desde el ER hasta la membrana plasmática, lo que explicaría la presencia de proteínas de membrana en los LDs caracterizados.

De acuerdo a esta propuesta, cabe mencionar que numerosas proteínas de membrana han sido detectadas en otros proteomas de LDs (Brocard et al., 2017), junto a proteínas implicadas en transporte intracelular. Un ejemplo a este respecto lo constituyen dos proteínas del sistema SNARE detectadas también en otros proteomas de LDs (Brocard et al., 2017; AT4G04910 y AT3G56190). De hecho, en células de mamífero se ha propuesto que proteínas SNARE específicas pueden transitar desde la membrana plasmática o endosomas a los LDs, en donde juegan un papel relevante en el crecimiento de estos orgánulos (Boström et al., 2007). De la misma manera, la presencia de ATPasas del tonoplasto en los LDs puede ser consecuencia del contacto entre los LDs y las vacuolas tal y como ocurre en levaduras, en las que los LDs pueden ser dirigidos a las vacuolas para su degradación mediante un proceso de microautofagia (Vevea et al., 2015).

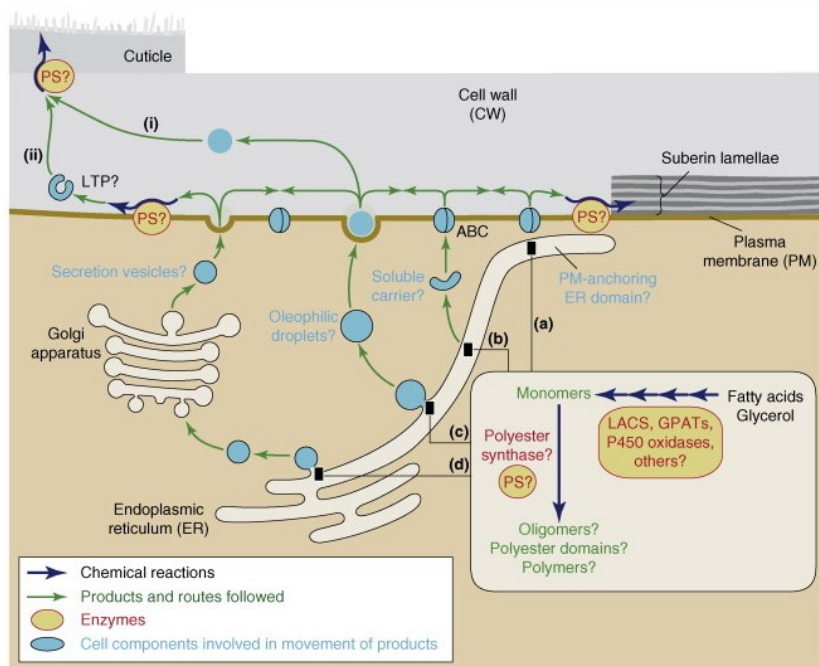
En relación a este punto hay que mencionar la conexión de las proteínas Rab con el tráfico intracelular. Esta familia de proteínas participa en la formación y transporte de vesículas, así como en el reconocimiento y fusión de membranas (Rutherford y Moore, 2002; Woollard y Moore, 2008). Al igual que en nuestros proteomas, la presencia de proteínas Rab en LDs ha sido documentada con anterioridad (Yang et al., 2012b; Li y Yu, 2016; Li et al., 2017; Zappa et al., 2017).

Teniendo en consideración todo lo anterior, el análisis de los proteomas caracterizados en este trabajo apoya el papel de los LDs en el tráfico intracelular y el transporte a través de la membrana. Igualmente, la composición de los proteomas caracterizados sustenta la participación de los LDs en la respuesta de las plantas a estrés y estímulos bióticos y abióticos.

Al contrario de lo que sucede con las proteínas de membrana, la comparación de los proteomas caracterizados en nuestro estudio con otros proteomas de LDs pone de manifiesto la ausencia de proteínas pertenecientes a los plastoglóbulos (Ytterberg et al., 2006; Bréhélin y Nacir, 2013) (Tabla IV). Estos orgánulos, denominados también como cuerpos lipídicos de plastidios, son similares a los LDs citosólicos, y suelen encontrarse en las proximidades de las membranas tilacoidales. De hecho, a menudo representan un problema en el estudio de los proteomas de LDs de plantas, ya que por la similitud de sus características físicas pueden ser copurificados con los LDs citoplasmáticos (Besagni et al., 2011; Lundquist et al., 2012b). Por ello, algunos estudios eliminan de los resultados proteómicos las proteínas correspondientes a estos LDs (Brocard et al., 2017).

En nuestro trabajo hemos podido confirmar la presencia de las proteínas GPAT4, GPAT8 y ALDH3F1 en los LDs de *Nicotiana benthamiana* mediante expresión transitoria, así como de las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3, cuya presencia en los LDs de *Arabidopsis* había sido demostrada anteriormente (Aubert et al., 2010; Shimada et al., 2014). Estos resultados apoyan la validez de los datos proteómicos obtenidos en nuestro estudio. La obtención y caracterización de plantas transgénicas que expresen las proteínas de interés bajo el control de sus correspondientes promotores nos permitirá examinar en mayor detalle el movimiento de estas proteínas y su localización en distintas condiciones y tejidos de la planta.

La presencia de enzimas aciltransferasas como GPAT4 y GPAT8 puede tener importantes implicaciones en la función de los LDs formados en los tejidos vegetativos de la planta. Estas proteínas, que se localizan principalmente en el retículo endoplásmico, participan en la síntesis de TAGs y de los monómeros de cutina, un poliéster insoluble de hidroxiácidos grasos de cadena larga, que constituye el principal componente de la cutícula de las plantas (Li et al., 2007). El estudio de estas estructuras celulares ha permitido identificar algunos de los genes que participan en la síntesis de los monómeros que la integran, en su transporte, en la polimerización de los monómeros y en los mecanismos de regulación que controlan la síntesis de estos polímeros (Pollard et al., 2008; Yeats y Rose, 2013; Domínguez et al., 2015). Los monómeros de cutina se transportan desde el ER a través de la membrana plasmática y la pared celular hasta la zona en la que ocurre su polimerización. Se desconoce el mecanismo empleado por las células para llevar a cabo este transporte, aunque en algunos modelos se han propuesto que los lípidos serían dirigidos directamente desde el ER a la membrana plasmática mediante sitios de contacto entre ambas estructuras (Pollard et al., 2008) (Figura 15). Nuestros resultados permiten proponer la participación de los LDs en este proceso. Esta idea había sido propuesta con anterioridad y en ella los LDs estarían implicados en el transporte de monómeros de MAG hasta la membrana plasmática (Pollard et al., 2008; Bernard y Joubès, 2013) (Figura 15). A favor de esta hipótesis estaría la naturaleza propia de los LDs que al contener un núcleo de TAGs podría albergar fácilmente compuestos hidrófobos que tendrían dificultades para atravesar un medio acuoso como es el citosol de la célula. Se ha descrito la participación de transportadores de tipo ABC tales como ABCG11, ABCG13 y ABCG32 en el transporte de monómeros de cutina al exterior de la membrana plasmática (Yeats y Rose, 2013). Aunque ninguno de ellos se encuentra presente en los proteomas caracterizados en nuestro estudio, cabe mencionar la



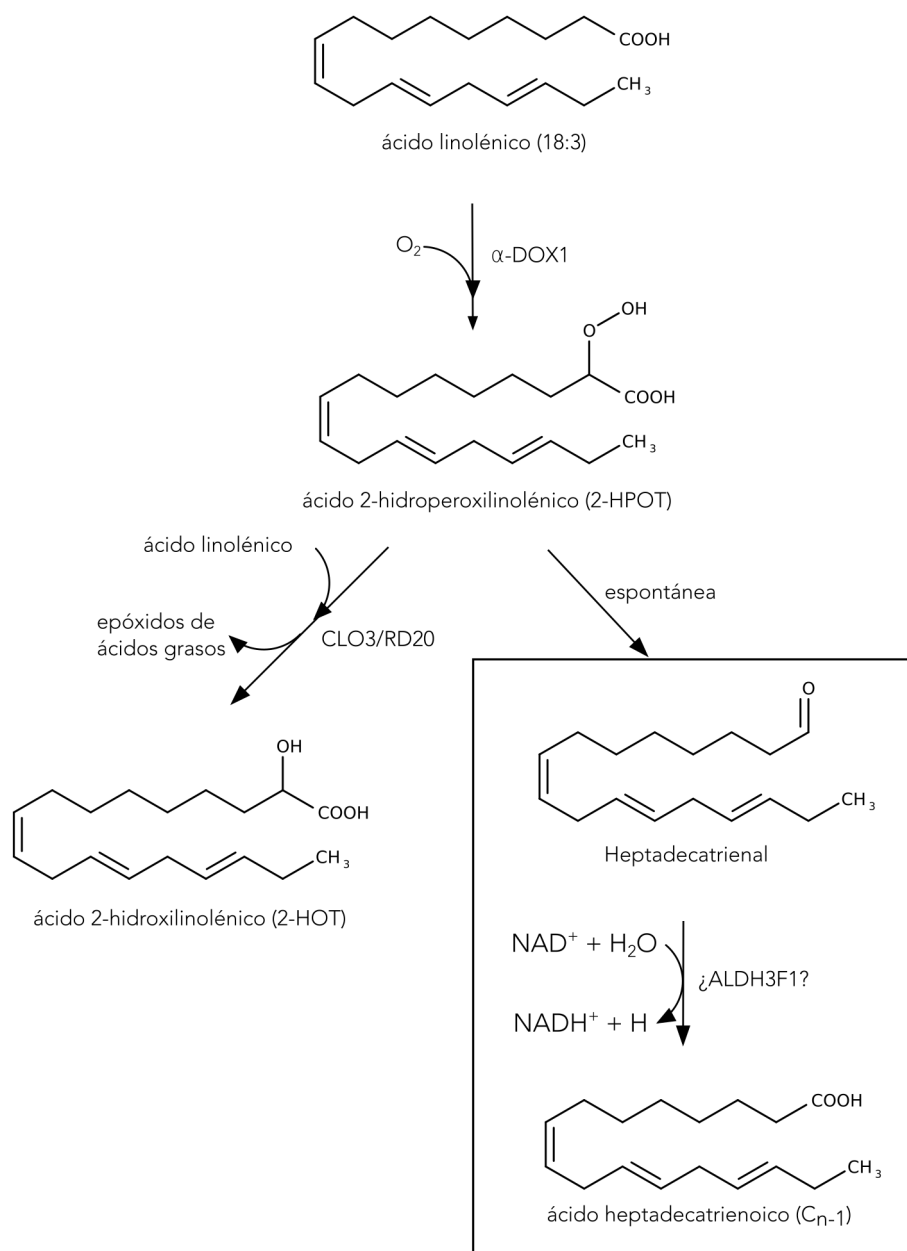
**Figura 15. Posibles mecanismos y localización celular del ensamblaje de cutina y suberina.** Se muestran algunas de las hipótesis actuales para los mecanismos de exportación de los monómeros al exterior celular. a) Directamente gracias a un dominio de unión entre el ER y la membrana plasmática. b) Mediante proteínas transportadoras citoplasmáticas. c) Mediante "partículas osmófilicas" que podrían corresponderse con LDs. d) Secreción mediada por el complejo de Golgi. Tomado de Pollard et al., 2008.

presencia de los transportadores ABCG40 (detectado en los proteomas de las plantas de 72 hpi) y PEN3/ABCG36. El transportador ABCG40 ha sido caracterizado como un transportador de ABA (Jarzyniak y Jasiński, 2014), mientras que PEN3/ABCG36 participa en la resistencia basal (Stein et al., 2006). Además de las enzimas GPAT4 y GPAT8, en los proteomas caracterizados encontramos la presencia de otra proteína, CER10, relacionada también con la cutina, que corresponde a una enoil-CoA reductasa (que forma parte del complejo proteico FAE, *Fatty Acid Elongasa*) que participa en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (VLCFA) (Yeats y Rose, 2013), cuyo papel en LDs quedaría por determinar.

El análisis proteómico de los LDs llevado a cabo en este trabajo pone de manifiesto la presencia de proteínas específicas en dichos orgánulos entre las que se incluyen las proteínas  $\alpha$ -DOX1 y CLO3 cuya localización en LDs había sido previamente identificada (Aubert et al., 2010; Shimada et al., 2014). La caracterización funcional de estas enzimas en plantas de *Arabidopsis* había puesto de manifiesto que el producto de ambas

actividades, la oxilipina 2-HOT tiene actividad antifúngica frente al hongo *Colletotrichum* inductor de la formación de cuerpos lipídicos (Shimada et al., 2014). Estudios anteriores a este trabajo indicaban que el 2-HOT no muestra actividad antimicrobiana cuando se incubaba en presencia de otros patógenos (Hamberg et al., 2003; Prost et al., 2005), por lo que la actividad *in vivo* de esta oxilipina no ha sido establecida de manera definitiva. En este sentido cabe mencionar que el análisis de plantas transgénicas con niveles alterados de actividad  $\alpha$ -DOX1 en *Arabidopsis* no ejerce cambios importantes en el crecimiento bacteriano (De León et al., 2002).

A diferencia de lo que ocurre en los LDs de células animales, en nuestro trabajo no hemos detectado la presencia de lipoxigenasas en los LDs caracterizados. Igualmente, tampoco hemos observado la localización de la proteína LOX1 en LDs tras su expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana*. De hecho, y a excepción de una aldehído deshidrogenasa ALDH3F1 que podría actuar sobre los derivados lipídicos producidos por la acción de la enzima  $\alpha$ -DOX1 (Figura 16), en los LDs examinados no hemos detectado la presencia de otras proteínas que pudieran participar en la síntesis de oxilipinas. Por ello, y aunque proteínas tales como citocromos, de función desconocida hasta el momento, pudieran intervenir en procesos relacionados con la síntesis de estos derivados lipídicos, los resultados obtenidos en este estudio indican que la participación de los LDs en la síntesis de oxilipinas sería menos relevante que la asignada a los LDs caracterizados en mamíferos. Existe, sin embargo, la posibilidad de que los LDs formados en otras condiciones o en respuesta a otros estímulos pudieran intervenir en este procesos y que, por tanto, los LDs formados en la planta podrían realizar funciones específicas que difieran de acuerdo a los estímulos que disparan su formación.



**Figura 16. Modelo de acción propuesto para ALDH3F1 en el metabolismo de oxilipinas.** Un ácido graso insaturado de cadena larga como el linolénico es transformado a ácido hidroperoxilínolénico (2-HPOT) por acción de  $\alpha$ -DOX1, el cual al ser inestable puede derivar a heptadecatrienal de forma espontánea (decarboxilación) o bien ser convertido a 2-HOT gracias a la acción de CLO3 (Shimada et al., 2014). El aldehído se transformaría en un ácido carboxílico de un carbono menos gracias a la acción de la aldehído deshidrogenasa ALDH3F1 con la participación de coenzimas.

# Conclusiones

## Conclusiones

1. La formación de cuerpos lipídicos en hojas de *Arabidopsis* se induce durante la senescencia de la planta y en hojas jóvenes en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*.
2. El establecimiento de un método de purificación nos ha permitido obtener fracciones de LDs a partir de estos tejidos, que han sido analizados mediante microscopía, citometría de flujo y espectrometría de masas.
3. Los LDs obtenidos presentan un aspecto homogéneo cuyo tamaño oscila entre 1 y 1,5  $\mu\text{m}$ . La tinción de las muestras con el colorante específico de LDs BODIPY puso de manifiesto la pureza de las fracciones de LDs caracterizadas.
4. La cuantificación de LDs en las muestras obtenidas nos permitió estimar el rendimiento del protocolo empleado en  $\sim 500$  LDs/mg en hojas infectadas durante 24 h,  $\sim 1500$  LDs/mg en hojas infectadas durante 72 h y  $\sim 1700$  LDs/mg en hojas senescentes.
5. La determinación del proteoma de los LDs caracterizados permitió definir la presencia de 72 proteínas en los LDs de hojas senescentes y de 70 y 81 proteínas en las muestras de LDs procedentes de tejidos infectados durante 24 y 72 horas, respectivamente.
6. Las proteínas de los LDs caracterizados no coinciden con las identificadas en los LDs de semillas y apoyan la participación de los LDs examinados en procesos distintos a los atribuidos a los LDs de semillas en donde se utilizan para el almacenamiento de lípidos que servirán como fuente de energía durante la germinación.



7. Los proteomas caracterizados comparten alrededor del 50% de su contenido proteico, y apoyan la participación de estos orgánulos en funciones comunes en cada uno de los tejidos examinados, así como de funciones específicas en cada caso.
8. El análisis de las proteínas presentes en los proteomas caracterizados en comparación con el proteoma completo de *Arabidopsis*, muestran un enriquecimiento en proteínas relacionadas con el tráfico intracelular, y en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.
9. Entre las proteínas identificadas, la expresión transitoria de proteínas de fusión a GFP en plantas de *Nicotiana benthamiana* nos ha permitido confirmar la localización de las proteínas GPAT4, GPAT8, ALDH3F1,  $\alpha$ -DOX1 y CLO3 en cuerpos lipídicos formados durante la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. A diferencia de estos resultados, la proteína PAD3:GFP, aparece distribuida en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico formando pequeñas vesículas.
10. La naturaleza de las proteínas identificadas sugieren la participación de los LDs en la modificación de los lípidos de membrana y/o de los polímeros lipídicos que cubren la superficie de la hoja, así como en el transporte de proteínas desde el ER hasta la superficie celular.

# Bibliografía

## Bibliografía

- Abell BM, Hahn M, Holbrook LA, Moloney MM** (2004) Membrane topology and sequence requirements for oil body targeting of oleosin. *Plant J* **37**: 461–470
- Abell BM, Holbrook LA, Abenes M, Murphy DJ, Hills MJ, Moloney MM** (1997) Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *Plant Cell* **9**: 1481–1493
- Adeyo O, Horn PJ, Lee S, Binns DD, Chandrabhas A, Chapman KD, Goodman JM** (2011) The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* **192**: 1043–1055
- Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P** (2004) Arabidopsis Plasma Membrane Proteomics Identifies Components of Transport, Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Plant Cell Physiol* **45**: 1543–1556
- Alvarez ME** (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**: 429–442
- Andriotis Vasilios M. E., Pike Marilyn J., Kular Baldeep, Rawsthorne Stephen, Smith Alison M.** (2010) Starch turnover in developing oilseed embryos. *New Phytol* **187**: 791–804
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399
- Asai S, Ohta K, Yoshioka H** (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **20**: 1390–1406
- Aubert Y, Vile D, Pervent M, Aldon D, Ranty B, Simonneau T, Vavas seur A, Galaud J-P** (2010) RD20, a Stress-Inducible Oleosin, Participates in Stomatal Control, Transpiration and Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **51**: 1975–1987
- Averyanov A** (2009) Oxidative burst and plant disease resistance. *Front Biosci Elite Ed* **1**: 142–152
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S** (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2014/360438
- Bailey AP, Koster G, Guillermier C, Hirst EMA, MacRae JI, Lechene CP, Postle AD, Gould AP** (2015) Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* **163**: 340–353
- Baker A, Graham IA, Holdsworth M, Smith SM, Theodoulou FL** (2006) Chewing the fat:  $\beta$ -oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci* **11**: 124–132
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C** (2009a) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* **44**: 85–95
- Bannenberg G, Martínez M, Rodríguez MJ, López MA, León IP de, Hamberg M, Castresana C** (2009b) Functional Analysis of  $\alpha$ -DOX2, an Active  $\alpha$ -Dioxygenase Critical for Normal Development in Tomato Plants. *Plant Physiol* **151**: 1421–1432
- Barbosa AD, Siniosoglou S** (2017) Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1864**: 1459–1468
- Barneda D, Christian M** (2017) Lipid droplet growth: regulation of a dynamic organelle. *Curr Opin Cell Biol* **47**: 9–15

- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L** (2008) Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. Arab Book Am Soc Plant Biol. doi: 10.1199/tab.0113
- Beaudoin F, Napier JA** (2000) The targeting and accumulation of ectopically expressed oleosin in non-seed tissues of Arabidopsis thaliana. Planta **210**: 439–445
- Beevers H** (1961) Metabolic Production of Sucrose from Fat. Nature **191**: 433–436
- Beller M, Bulankina AV, Hsiao H-H, Urlaub H, Jäckle H, Kühnlein RP** (2010) PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in Drosophila. Cell Metab **12**: 521–532
- Beller M, Riedel D, Jänsch L, Dieterich G, Wehland J, Jäckle H, Kühnlein RP** (2006) Characterization of the Drosophila lipid droplet subproteome. Mol Cell Proteomics MCP **5**: 1082–1094
- Bernard A, Joubès J** (2013) Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. Prog Lipid Res **52**: 110–129
- Bersuker K, Olzmann JA** (2017) Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids **1862**: 1166–1177
- Berthelot K, Peruch F, Lecomte S** (2016) Highlights on Hevea brasiliensis (pro)hevein proteins. Biochimie **127**: 258–270
- Besagni C, Piller LE, Bréhélin C** (2011) Preparation of plastoglobules from Arabidopsis plastids for proteomic analysis and other studies. Methods Mol Biol Clifton NJ **775**: 223–239
- Blée E** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. Prog Lipid Res **37**: 33–72
- Blée E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci **7**: 315–322
- Blée E, Flenet M, Boachon B, Fauconnier M-L** (2012) A non-canonical caleosin from Arabidopsis efficiently epoxidizes physiological unsaturated fatty acids with complete stereoselectivity. FEBS J **279**: 3981–3995
- Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, Fernandez-Rodriguez J, Ericson J, Nilsson T, Borén J, et al** (2007) SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. Nat Cell Biol **9**: 1286–1293
- Bouvier-Navé P, Berna A, Noiriel A, Compagnon V, Carlsson AS, Banas A, Stymne S, Schaller H** (2010) Involvement of the Phospholipid Sterol Acyltransferase1 in Plant Sterol Homeostasis and Leaf Senescence. Plant Physiol **152**: 107–119
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248–254
- Bréhélin C, Nacir H** (2013) When Proteomics Reveals Unsuspected Roles: The Plastoglobule Example. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00114
- Brocard L, Immel F, Coulon D, Esnay N, Tuphile K, Pascal S, Claverol S, Fouillen L, Bessoule J-J, Bréhélin C** (2017) Proteomic Analysis of Lipid Droplets from Arabidopsis Aging Leaves Brings New Insight into Their Biogenesis and Functions. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2017.00894
- Browman DT, Hoegg MB, Robbins SM** (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. Trends Cell Biol **17**: 394–402

- Browse J** (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 183–205
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL** (2017) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed. Wiley, Hoboken, NJ
- Cai Y, Goodman JM, Pyc M, Mullen RT, Dyer JM, Chapman KD** (2015) Arabidopsis SEIPIN Proteins Modulate Triacylglycerol Accumulation and Influence Lipid Droplet Proliferation. *Plant Cell* **27**: 2616–2636
- Capeau J, Magré J, Caron-Debarle M, Lagathu C, Antoine B, Béréziat V, Lascols O, Bastard J-P, Vigouroux C** (2010) Human lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. *Endocr Dev* **19**: 1–20
- Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT** (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* **53**: 215–226
- Chen JC, Tsai CC, Tzen JT** (1999) Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol* **40**: 1079–1086
- Chen X, Goodman JM** (2017) The collaborative work of droplet assembly. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1862**: 1205–1211
- Chevalier AS, Chaumont F** (2015) Trafficking of Plant Plasma Membrane Aquaporins: Multiple Regulation Levels and Complex Sorting Signals. *Plant Cell Physiol* **56**: 819–829
- Chini A, Boter M, Solano R** (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS J* **276**: 4682–4692
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ** (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**: 803–814
- Choudhary V, Ojha N, Golden A, Prinz WA** (2015) A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *J Cell Biol* **211**: 261–271
- Christiansen MW, Gregersen PL** (2014) Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *J Exp Bot* **65**: 4009–4022
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell Mol Biol* **16**: 735–743
- Coca M, San Segundo B** (2010) AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* **63**: 526–540
- Cooper TG, Beevers H** (1969)  $\beta$  Oxidation in Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. *J Biol Chem* **244**: 3514–3520
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 355–381
- D'Andréa S, Jolivet P, Boulard C, Larré C, Froissard M, Chardot T** (2007) Selective one-step extraction of *Arabidopsis thaliana* seed oleosins using organic solvents. *J Agric Food Chem* **55**: 10008–10015

- De Domenico S, Bonsegna S, Lenucci MS, Poltronieri P, Di Sansebastiano GP, Santino A** (2011) Localization of seed oil body proteins in tobacco protoplasts reveals specific mechanisms of protein targeting to leaf lipid droplets. *J Integr Plant Biol* **53**: 858–868
- De León IP, Sanz A, Hamberg M, Castresana C** (2002) Involvement of the Arabidopsis  $\alpha$ -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J* **29**: 61–72
- Debener T, Lehnackers H, Arnold M, Dangl JL** (1991) Identification and molecular mapping of a single Arabidopsis thaliana locus determining resistance to a phytopathogenic Pseudomonas syringae isolate. *Plant J Cell Mol Biol* **1**: 289–302
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**: 4777–4788
- Ding Y, Zhang S, Yang L, Na H, Zhang P, Zhang H, Wang Y, Chen Y, Yu J, Huo C, et al** (2013) Isolating lipid droplets from multiple species. *Nat Protoc* **8**: 43–51
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* **179**: 45–51
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A** (2015) Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends Plant Sci* **20**: 551–558
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte C-P, Schulze WX, Romeis T** (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8744–8749
- Dunkley TPJ, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, et al** (2006) Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 6518–6523
- Eastmond PJ** (2006) SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* **18**: 665–675
- Eastmond PJ, Graham IA** (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci* **6**: 72–78
- Eckardt NA** (2008) Oxylipin Signaling in Plant Stress Responses. *Plant Cell* **20**: 495–497
- Fang FC** (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**: 820–832
- Farmer EE, Alméras E, Krishnamurthy V** (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 372–378
- Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltzman E, et al** (2005) Comparison of the complete genome sequences of Pseudomonas syringae pv. syringae B728a and pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11064–11069
- Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR** (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol Plant Pathol* **8**: 677–700
- Feussner I, Kindl H** (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett* **298**: 223–225

- Feussner I, Kühn H, Wasternack C** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**: 268–273
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R** (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**: 344–350
- Footitt S, Slocombe SP, Lerner V, Kurup S, Wu Y, Larson T, Graham I, Baker A, Holdsworth M** (2002) Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO J* **21**: 2912–2922
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866–1875
- Frandsen G, Müller-Uri F, Nielsen M, Mundy J, Skriver K** (1996) Novel plant Ca(2+)-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J Biol Chem* **271**: 343–348
- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 839–863
- Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, Higashi Y, Kojima S, Takano T** (2004) Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 47–59
- Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, Browse J** (2004) Peroxisomal Acyl-CoA Synthetase Activity Is Essential for Seedling Development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**: 394–405
- Gao Q, Goodman JM** (2015) The lipid droplet—a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol*. doi: 10.3389/fcell.2015.00049
- Ghosh S, Hudak KA, Dumbroff EB, Thompson JE** (1994) Release of Photosynthetic Protein Catabolites by Blebbing from Thylakoids. *Plant Physiol* **106**: 1547–1553
- Gidda SK, Park S, Pyc M, Yurchenko O, Cai Y, Wu P, Andrews DW, Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT** (2016) Lipid Droplet-Associated Proteins (LDAPs) Are Required for the Dynamic Regulation of Neutral Lipid Compartmentation in Plant Cells. *Plant Physiol* **170**: 2052–2071
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227
- Göbel C, Feussner I, Hamberg M, Rosahl S** (2002) Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta* **1584**: 55–64
- Goepfert S, Poirier Y** (2007)  $\beta$ -Oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 245–251
- Goold H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y** (2015) Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Rep* **34**: 545–555
- Graham IA** (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 115–142
- Gubern A, Casas J, Barceló-Torns M, Barneda D, de la Rosa X, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E** (2008) Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem* **283**: 27369–27382
- Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Walther TC** (2009) Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* **122**: 749–752

- Hachez C, Besserer A, Chevalier AS, Chaumont F** (2013) Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends Plant Sci* **18**: 344–352
- Hachez C, Laloux T, Reinhardt H, Cavez D, Degand H, Grefen C, De Rycke R, Inzé D, Blatt MR, Russinova E, et al** (2014) Arabidopsis SNAREs SYP61 and SYP121 Coordinate the Trafficking of Plasma Membrane Aquaporin PIP2;7 to Modulate the Cell Membrane Water Permeability[W]. *Plant Cell* **26**: 3132–3147
- Ham JH, Kim MG, Lee SY, Mackey D** (2007) Layered basal defenses underlie non-host resistance of Arabidopsis to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Plant J Cell Mol Biol* **51**: 604–616
- Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez MJ, Castresana C** (2005)  $\alpha$ -Dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 169–174
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C** (1999)  $\alpha$ -Oxidation of Fatty Acids in Higher Plants IDENTIFICATION OF A PATHOGEN-INDUCIBLE OXYGENASE (PIOX) AS AN  $\alpha$ -DIOXYGENASE AND BIOSYNTHESIS OF 2-HYDROPEROXYLINOLENIC ACID. *J Biol Chem* **274**: 24503–24513
- Hamberg M, Sanz A, Rodriguez MJ, Calvo AP, Castresana C** (2003) Activation of the Fatty Acid  $\alpha$ -Dioxygenase Pathway during Bacterial Infection of Tobacco Leaves FORMATION OF OXYLIPINS PROTECTING AGAINST CELL DEATH. *J Biol Chem* **278**: 51796–51805
- Hammond-Kosack KE, Parker JE** (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 177–193
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580
- Hanano A, Almously I, Shaban M, Rahman F, Blee E, Murphy DJ** (2016) Biochemical, Transcriptional, and Bioinformatic Analysis of Lipid Droplets from Seeds of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Their Use as Potent Sequestration Agents against the Toxic Pollutant, 2,3,7,8-Tetrachlorinated Dibenzo-p-Dioxin. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00836
- Hanano A, Burcklen M, Flenet M, Ivancich A, Louwagie M, Garin J, Blée E** (2006) Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif. *J Biol Chem* **281**: 33140–33151
- Hayashi Y, Hayashi M, Hayashi H, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2001) Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana* *ped1* mutant. *Protoplasma* **218**: 83–94
- Heard W, Sklenář J, Tomé DFA, Robatzek S, Jones AME** (2015) Identification of Regulatory and Cargo Proteins of Endosomal and Secretory Pathways in *Arabidopsis thaliana* by Proteomic Dissection. *Mol Cell Proteomics* **14**: 1796–1813
- Herpen TWJM van, Cankar K, Nogueira M, Bosch D, Bouwmeester HJ, Beekwilder J** (2010) *Nicotiana benthamiana* as a Production Platform for Artemisinin Precursors. *PLOS ONE* **5**: e14222
- Hodges BDM, Wu CC** (2010) Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res* **51**: 262–273
- Horn PJ, James CN, Gidda SK, Kilaru A, Dyer JM, Mullen RT, Ohlrogge JB, Chapman KD** (2013) Identification of a New Class of Lipid Droplet-Associated Proteins in Plants. *Plant Physiol* **162**: 1926–1936



- Horn PJ, Ledbetter NR, James CN, Hoffman WD, Case CR, Verbeck GF, Chapman KD** (2011) Visualization of lipid droplet composition by direct organelle mass spectrometry. *J Biol Chem* **286**: 3298–3306
- Hsieh K, Huang AHC** (2004) Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol* **136**: 3427–3434
- Hua J, Meyerowitz EM** (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**: 261–271
- Huang AH** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol* **110**: 1055–1061
- Huang AHC** (1992) Oil Bodies and Oleosins in Seeds. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 177–200
- Huang AHC** (2018) Plant lipid droplets and their associated oleosin and other proteins: potential for rapid advances. *Plant Physiol* pp.01677.2017
- Huang C-Y, Huang AHC** (2017) Unique Motifs and Length of Hairpin in Oleosin Target the Cytosolic Side of Endoplasmic Reticulum and Budding Lipid Droplet. *Plant Physiol* **174**: 2248–2260
- Huang N-L, Huang M-D, Chen T-LL, Huang AHC** (2013) Oleosin of Subcellular Lipid Droplets Evolved in Green Algae. *Plant Physiol* **161**: 1862–1874
- Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W** (2008) BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**: 488
- Inoue H, Nojima, Okayama** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23–28
- Ischebeck T** (2016) Lipids in pollen — They are different. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1861**: 1315–1328
- Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneiter R** (2011) Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **124**: 2424–2437
- Jacquier N, Mishra S, Choudhary V, Schneiter R** (2013) Expression of oleosin and perilipins in yeast promotes formation of lipid droplets from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **126**: 5198–5209
- James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, Mullen RT, Dyer JM, Anderson RGW, Chapman KD** (2010) Disruption of the *Arabidopsis* CGI-58 homologue produces Chanarin–Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 17833–17838
- Jarzyniak KM, Jasiński M** (2014) Membrane transporters and drought resistance – a complex issue. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00687
- Jiang P-L, Tzen JTC** (2010) Caleosin serves as the major structural protein as efficient as oleosin on the surface of seed oil bodies. *Plant Signal Behav* **5**: 447–449
- Jolivet P, Roux E, d'Andrea S, Davanture M, Negroni L, Zivy M, Chardot T** (2004) Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol Biochem* **42**: 501–509
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Kachroo A, Kachroo P** (2009) Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 153–176

- Kassan A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJN, Fajardo A, Gelabert-Baldrich M, Tebar F, Enrich C, et al** (2013) Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J Cell Biol* **203**: 985–1001
- Katavic V, Agrawal GK, Hajduch M, Harris SL, Thelen JJ** (2006) Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars. *PROTEOMICS* **6**: 4586–4598
- Kaup MT, Froese CD, Thompson JE** (2002) A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol* **129**: 1616–1626
- Kelly AA, Quettier A-L, Shaw E, Eastmond PJ** (2011) Seed Storage Oil Mobilization Is Important But Not Essential for Germination or Seedling Establishment in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **157**: 866–875
- Kendrick MD, Chang C** (2008) Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 479–485
- Kim EY, Park KY, Seo YS, Kim WT** (2016) *Arabidopsis* Small Rubber Particle Protein Homolog SRPs Play Dual Roles as Positive Factors for Tissue Growth and Development and in Drought Stress Responses. *Plant Physiol* **170**: 2494–2510
- Kim EY, Seo YS, Lee H, Kim WT** (2010) Constitutive expression of CaSRP1, a hot pepper small rubber particle protein homolog, resulted in fast growth and improved drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* **232**: 71–83
- Kim HU, Hsieh K, Ratnayake C, Huang AHC** (2002) A Novel Group of Oleosins Is Present Inside the Pollen of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**: 22677–22684
- Kim YY, Jung KW, Yoo KS, Jeung JU, Shin JS** (2011) A stress-responsive caleosin-like protein, AtCLO4, acts as a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **52**: 874–884
- King EO, Ward MK, Raney DE** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**: 301–307
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J** (2008) Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **69**: 2127–2132
- Kohlwein SD, Veenhuis M, Klei IJ van der** (2013) Lipid Droplets and Peroxisomes: Key Players in Cellular Lipid Homeostasis or A Matter of Fat—Store 'em Up or Burn 'em Down. *Genetics* **193**: 1–50
- Kory N, Farese RV, Walther TC** (2016) Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol* **26**: 535–546
- Lacey DJ, Beaudoin F, Dempsey CE, Shewry PR, Napier JA** (1999) The accumulation of triacylglycerols within the endoplasmic reticulum of developing seeds of *Helianthus annuus*. *Plant J* **17**: 397–405
- Laibach N, Post J, Twyman RM, Gronover CS, Prüfer D** (2015) The characteristics and potential applications of structural lipid droplet proteins in plants. *J Biotechnol* **201**: 15–27
- Laloi C, Apel K, Danon A** (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 323–328
- Lamb C, Dixon RA** (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251–275

- Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* **3**: 309–319
- Layerenza JP, González P, García de Bravo MM, Polo MP, Sisti MS, Ves-Losada A (2013) Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1831**: 327–340
- Leber R, Zinser E, Zellnig G, Paltauf F, Daum G (1994) Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl* **10**: 1421–1428
- Lee JN, Kim H, Yao H, Chen Y, Weng K, Ye J (2010) Identification of Ubx8 protein as a sensor for unsaturated fatty acids and regulator of triglyceride synthesis. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 21424–21429
- Li C, Luo X, Zhao S, Siu GK, Liang Y, Chan HC, Satoh A, Yu SS (2017) COPI–TRAPP II activates Rab18 and regulates its lipid droplet association. *EMBO J* **36**: 441–457
- Li C, Yu SS (2016) Rab proteins as regulators of lipid droplet formation and lipolysis. *Cell Biol Int* **40**: 1026–1032
- Li Y, Beisson F, Koo AJK, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18339–18344
- Li Z, Thiel K, Thul PJ, Beller M, Kühnlein RP, Welte MA (2012) Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos. *Curr Biol CB* **22**: 2104–2113
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TP, et al (2013) Acyl-Lipid Metabolism. *Arab Book Am Soc Plant Biol*. doi: 10.1199/tab.0161
- Li-Beisson Y, Verdier G, Xu L, Beisson F (2001) Cutin and Suberin Polyesters. eLS. doi: 10.1002/9780470015902.a0001920.pub3
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf Senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 115–136
- Lin L-J, Tai SSK, Peng C-C, Tzen JTC (2002) Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. *Plant Physiol* **128**: 1200–1211
- Listenberger LL, Brown DA (2007) Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 24*: Unit 24.2
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16–20
- López MA, Bannenberg G, Castresana C (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 420–427
- López-Ribera I, Paz JLL, Repiso C, García N, Miquel M, Hernández ML, Martínez-Rivas JM, Vicient CM (2014) The Evolutionary Conserved Oil Body Associated Protein OBAP1 Participates in the Regulation of Oil Body Size. *Plant Physiol* **164**: 1237–1249
- Lundquist PK, Poliakov A, Bhuiyan NH, Zybaïlov B, Sun Q, van Wijk KJ (2012a) The Functional Network of the Arabidopsis Plastoglobule Proteome Based on Quantitative Proteomics and Genome-Wide Coexpression Analysis1. *Plant Physiol* **158**: 1172–1192

- Lundquist PK, Poliakov A, Bhuiyan NH, Zybailov B, Sun Q, Wijk KJ van** (2012b) The Functional Network of the Arabidopsis Plastoglobule Proteome Based on Quantitative Proteomics and Genome-Wide Coexpression Analysis. *Plant Physiol* **158**: 1172–1192
- Lynes EM, Simmen T** (2011) Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): How diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1813**: 1893–1905
- Mackey D, McFall AJ** (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol Microbiol* **61**: 1365–1371
- Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, Meier M, Mégarbané A, Bachy A, et al** (2001) Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* **28**: 365–370
- Mak HY** (2012) Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* **53**: 28–33
- Malinsky J, Opekarová M, Grossmann G, Tanner W** (2013) Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 501–529
- Marcos R, Izquierdo Y, Velloso T, Kulasekaran S, Cascón T, Hamberg M, Castresana C** (2015) 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Activate Brassinosteroid Signaling to Promote Cell Wall-Based Defense and Limit Pathogen Infection. *Plant Physiol* **169**: 2324–2334
- Marmagne A, Rouet M-A, Ferro M, Rolland N, Alcon C, Joyard J, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G** (2004) Identification of New Intrinsic Proteins in Arabidopsis Plasma Membrane Proteome. *Mol Cell Proteomics* **3**: 675–691
- McFie PJ, Stone SL, Banman SL, Stone SJ** (2010) Topological Orientation of Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase-1 (DGAT1) and Identification of a Putative Active Site Histidine and the Role of the N Terminus in Dimer/Tetramer Formation. *J Biol Chem* **285**: 37377–37387
- McLachlan DH, Lan J, Geilfus C-M, Dodd AN, Larson T, Baker A, Hōrak H, Kollist H, He Z, Graham I, et al** (2016) The Breakdown of Stored Triacylglycerols Is Required during Light-Induced Stomatal Opening. *Curr Biol* **26**: 707–712
- Meesapyodsuk D, Qiu X** (2011) A peroxygenase pathway involved in the biosynthesis of epoxy fatty acids in oat. *Plant Physiol* **157**: 454–463
- Meng X, Zhang S** (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 245–266
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* **2**: ra45
- Miquel M, Trigui G, d'Andréa S, Kelemen Z, Baud S, Berger A, Deruyffelaere C, Trubuil A, Lepiniec L, Dubreucq B** (2014) Specialization of Oleosins in Oil Body Dynamics during Seed Development in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiol* **164**: 1866–1878
- Montillet J-L, Chamnongpol S, Rustérucci C, Dat J, van de Cotte B, Agnel J-P, Battesti C, Inzé D, Van Breusegem F, Triantaphylidès C** (2005) Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* **138**: 1516–1526
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I** (2009) Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**: 511–517

- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935–944
- Mueller B, Klemm EJ, Spooner E, Claessen JH, Ploegh HL** (2008) SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12325–12330
- Murphy DJ** (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* **40**: 325–438
- Murphy DJ** (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog Lipid Res* **32**: 247–280
- Murphy DJ** (2012) The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* **249**: 541–585
- Murphy DJ, Cummins I** (1989) Seed oil-bodies: Isolation, composition and role of oil-body apolipoproteins. *Phytochemistry* **28**: 2063–2069
- Naested H, Frandsen GI, Jauh GY, Hernandez-Pinzon I, Nielsen HB, Murphy DJ, Rogers JC, Mundy J** (2000) Caleosins: Ca<sup>2+</sup>-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol Biol* **44**: 463–476
- Nguyen HM, Baudet M, Cuiné S, Adriano J-M, Barthe D, Billon E, Bruley C, Beisson F, Peltier G, Ferro M, et al** (2011) Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: With focus on proteins involved in lipid metabolism. *PROTEOMICS* **11**: 4266–4273
- Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, Miles GP, Stevens TJ, Dunkley TPJ, Munro S, Lilley KS, Dupree P** (2012) Putative Glycosyltransferases and Other Plant Golgi Apparatus Proteins Are Revealed by LOPIT Proteomics. *Plant Physiol* **160**: 1037–1051
- Nürnberg T, Lipka V** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* **6**: 335–345
- Obregón P, Martín R, Sanz A, Castresana C** (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol Biol* **46**: 67–77
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP** (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 765–779
- Onkokesung N, Gális I, von Dahl CC, Matsuoka K, Saluz H-P, Baldwin IT** (2010) Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant Physiol* **153**: 785–798
- Park S, Gidda SK, James CN, Horn PJ, Khoo N, Seay DC, Keereetaweep J, Chapman KD, Mullen RT, Dyer JM** (2013) The  $\alpha/\beta$  Hydrolase CGI-58 and Peroxisomal Transport Protein PXA1 Coregulate Lipid Homeostasis and Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1726–1739
- Park SH, Blackstone C** (2010) Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep* **11**: 515–521
- Partridge M, Murphy DJ** (2009) Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* **47**: 796–806
- Penfield S, Pinfield-Wells HM, Graham IA** (2006) Storage Reserve Mobilisation and Seedling Establishment in Arabidopsis. *Arab Book Am Soc Plant Biol*. doi: 10.1199/tab.0100

- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308–316
- Ploegh HL** (2007) A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* **448**: 435–438
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**: 236–246
- Poxleitner M, Rogers SW, Lacey Samuels A, Browse J, Rogers JC** (2006) A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination. *Plant J Cell Mol Biol* **47**: 917–933
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé M-T, Rosahl S, et al** (2005) Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiol* **139**: 1902–1913
- Pyc M, Cai Y, Gidda SK, Yurchenko O, Park S, Kretschmar FK, Ischebeck T, Valerius O, Braus GH, Chapman KD, et al** (2017a) Arabidopsis lipid droplet-associated protein (LDAP) – interacting protein (LDIP) influences lipid droplet size and neutral lipid homeostasis in both leaves and seeds. *Plant J* **92**: 1182–1201
- Pyc M, Cai Y, Greer MS, Yurchenko O, Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT** (2017b) Turning Over a New Leaf in Lipid Droplet Biology. *Trends Plant Sci* **22**: 596–609
- Qi Y, Katagiri F** (2012) Membrane microdomain may be a platform for immune signaling. *Plant Signal Behav* **7**: 454–456
- Quettier A-L, Eastmond PJ** (2009) Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiol Biochem* **47**: 485–490
- Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasino RM** (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* **5**: 278–282
- Quirino BF, Normanly J, Amasino RM** (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol Biol* **40**: 267–278
- Rey P, Gillet B, Römer S, Eymery F, Massimino J, Peltier G, Kuntz M** (2000) Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *Plant J* **21**: 483–494
- Robatzek S, Somssich IE** (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* **16**: 1139–1149
- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Després C** (2006) The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* **18**: 3670–3685
- Rottet S, Besagni C, Kessler F** (2015) The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1847**: 889–899
- Ruggiano A, Mora G, Buxó L, Carvalho P** (2016) Spatial control of lipid droplet proteins by the ERAD ubiquitin ligase Doa10. *EMBO J* **35**: 1644–1655
- Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, et al** (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid

- hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**: 36446–36455
- Rutherford S, Moore I** (2002) The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 518–528
- Rutter BD, Innes RW** (2017) Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins1. *Plant Physiol* **173**: 728–741
- Saito C, Ueda T** (2009) Chapter 4: functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *Int Rev Cell Mol Biol* **274**: 183–233
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanz A, Moreno JI, Castresana C** (1998) PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell* **10**: 1523–1537
- Sarmiento C, Ross JHE, Herman E, Murphy DJ** (1997) Expression and subcellular targeting of a soybean oleosin in transgenic rapeseed. Implications for the mechanism of oil-body formation in seeds. *Plant J* **11**: 783–796
- Savchenko TV, Zastrijnaja OM, Klimov VV** (2014) Oxylipins and plant abiotic stress resistance. *Biochem Mosc* **79**: 362–375
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al** (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682
- Schippers JHM, Schmidt R, Wagstaff C, Jing H-C** (2015) Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence1. *Plant Physiol* **169**: 914–930
- Schmidt MA, Herman EM** (2008) Suppression of soybean oleosin produces micro-oil bodies that aggregate into oil body/ER complexes. *Mol Plant* **1**: 910–924
- Schuberth C, Buchberger A** (2008) UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci CMLS* **65**: 2360–2371
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatoš A, Halkier BA, Glawischnig E** (2006) CYP71B15 (PAD3) Catalyzes the Final Step in Camalexin Biosynthesis. *Plant Physiol* **141**: 1248–1254
- Schuldiner M, Bohnert M** (2017) A different kind of love – lipid droplet contact sites. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1862**: 1188–1196
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J, et al** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400–405
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS** (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol* **121**: 267–280
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850–858

- Shimada TL, Hara-Nishimura I** (2015) Leaf oil bodies are subcellular factories producing antifungal oxylipins. *Curr Opin Plant Biol* **25**: 145–150
- Shimada TL, Shimada T, Takahashi H, Fukao Y, Hara-Nishimura I** (2008) A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**: 798–809
- Shimada TL, Takano Y, Hara-Nishimura I** (2015) Oil body-mediated defense against fungi: From tissues to ecology. *Plant Signal Behav* **10**: e989036
- Shimada TL, Takano Y, Shimada T, Fujiwara M, Fukao Y, Mori M, Okazaki Y, Saito K, Sasaki R, Aoki K, et al** (2014) Leaf oil body functions as a subcellular factory for the production of a phytoalexin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **164**: 105–118
- Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan J-C, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT, Dyer JM** (2006) Tung Tree DGAT1 and DGAT2 Have Nonredundant Functions in Triacylglycerol Biosynthesis and Are Localized to Different Subdomains of the Endoplasmic Reticulum. *Plant Cell* **18**: 2294–2313
- Siloto RMP, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL, Moloney MM** (2006) The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1961–1974
- Sparkes IA, Frigerio L, Tolley N, Hawes C** (2009) The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochem J* **423**: 145–155
- Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, Hou B-H, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S** (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *Plant Cell* **18**: 731–746
- Steppuhn A, Gaquerel E, Baldwin IT** (2010) The two alpha-dox genes of *Nicotiana attenuata*: overlapping but distinct functions in development and stress responses. *BMC Plant Biol* **10**: 171
- Stiti N, Missihoun TD, Kotchoni SO, Kirch H-H, Bartels D** (2011) Aldehyde Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: Biochemical Requirements, Metabolic Pathways, and Functional Analysis. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2011.00065
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T** (2011) REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE* **6**: e21800
- Suzuki M, Otsuka T, Ohsaki Y, Cheng J, Taniguchi T, Hashimoto H, Taniguchi H, Fujimoto T** (2012) Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. *Mol Biol Cell* **23**: 800–810
- Takahashi S, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2000) An *Arabidopsis* Gene Encoding a Ca<sup>2+</sup>-Binding Protein is Induced by Abscissic Acid during Dehydration. *Plant Cell Physiol* **41**: 898–903
- Taurino M, Costantini S, Domenico SD, Stefanelli F, Ruano G, Delgadillo MO, Sánchez-Serrano JJ, Sanmartín M, Santino A, Rojo E** (2018) SEIPIN Proteins Mediate Lipid Droplet Biogenesis to Promote Pollen Transmission and Reduce Seed Dormancy. *Plant Physiol* **176**: 1531–1546
- Terashima M, Freeman ES, Jinkerson RE, Jonikas MC** (2015) A fluorescence-activated cell sorting-based strategy for rapid isolation of high-lipid *Chlamydomonas* mutants. *Plant J* **81**: 147–159
- Thazar-Poulot N, Miquel M, Fobis-Loisy I, Gaude T** (2015) Peroxisome extensions deliver the *Arabidopsis* SDP1 lipase to oil bodies. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 4158–4163



- Thiam AR, Forêt L** (2016) The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1861**: 715–722
- Thiam AR, Jr RVF, Walther TC** (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 775
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**: 63–68
- Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Xu W, Su Z** (2017) agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res* **45**: W122–W129
- Tirinato L, Pagliari F, Limongi T, Marini M, Falqui A, Seco J, Candeloro P, Liberale C, Di Fabrizio E** (2017) An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int*. doi: 10.1155/2017/1656053
- Troncoso-Ponce MA, Cao X, Yang Z, Ohlrogge JB** (2013) Lipid turnover during senescence. *Plant Sci* **205–206**: 13–19
- Tsuda K, Katagiri F** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 459–465
- Tzen JT, Huang AH** (1992) Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol* **117**: 327–335
- Tzen JT, Peng CC, Cheng DJ, Chen EC, Chiu JM** (1997) A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. *J Biochem (Tokyo)* **121**: 762–768
- Uzbekov R, Roingeard P** (2013) Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections. *BMC Res Notes* **6**: 386
- Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831–846
- Vellosillo T, Vicente J, Kulasekaran S, Hamberg M, Castresana C** (2010) Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens. *Plant Physiol* **154**: 444–448
- Velmurugan N, Sung M, Yim SS, Park MS, Yang JW, Jeong KJ** (2013) Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry. *Bioresour Technol* **138**: 30–37
- Vermachova M, Purkrtova Z, Santrucek J, Jolivet P, Chardot T, Kodicek M** (2011) New protein isoforms identified within *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies combining chymotrypsin/trypsin digestion and peptide fragmentation analysis. *PROTEOMICS* **11**: 3430–3434
- Vevea JD, Garcia EJ, Chan RB, Zhou B, Schultz M, Di Paolo G, McCaffery JM, Pon LA** (2015) Role for lipid droplet biogenesis and microlipophagy in adaptation to lipid imbalance in yeast. *Dev Cell* **35**: 584–599
- Vicente J, Cascón T, Vicedo B, García-Agustín P, Hamberg M, Castresana C** (2012) Role of 9-Lipoxygenase and  $\alpha$ -Dioxygenase Oxylin Pathways as Modulators of Local and Systemic Defense. *Mol Plant* **5**: 914–928
- Vieyres G, Welsch K, Gerold G, Gentzsch J, Kahl S, Vondran FWR, Kaderali L, Pietschmann T** (2016) ABHD5/CGI-58, the Chanarin-Dorfman Syndrome Protein, Mobilises Lipid Stores for Hepatitis C Virus Production. *PLoS Pathog* **12**: e1005568

- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 177–206
- Wahlroos T, Soukka J, Denesyuk A, Wahlroos R, Korpela T, Kilby NJ** (2003) Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells. *Genes N Y N* **2000** **35**: 125–132
- Wältermann M, Hinz A, Robenek H, Troyer D, Reichelt R, Malkus U, Galla H-J, Kalscheuer R, Stöveken T, von Landenberg P, et al** (2005) Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol Microbiol* **55**: 750–763
- Walther TC, Chung J, Jr RVF** (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **33**: 491–510
- Walther TC, Farese RV** (2009) The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 459–466
- Wang C-W, Lee S-C** (2012) The ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein Ubx2/Ubx8 regulates lipid droplet homeostasis. *J Cell Sci* **125**: 2930–2939
- Wee K, Yang W, Sugii S, Han W** (2014) Towards a mechanistic understanding of lipodystrophy and seipin functions. *Biosci Rep*. doi: 10.1042/BSR20140114
- Welte MA** (2015) Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol CB* **25**: R470–R481
- Welte MA, Gould AP** (2017) Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1862**: 1260–1272
- Wilfling F, Haas JT, Walther TC, Jr RVF** (2014) Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **29**: 39–45
- Wilfling F, Wang H, Haas JT, Krahmer N, Gould TJ, Uchida A, Cheng J-X, Graham M, Christiano R, Fröhlich F, et al** (2013) Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Dev Cell* **24**: 384–399
- Woollard AAD, Moore I** (2008) The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 610–619
- Wymann MP, Schneider R** (2008) Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 162–176
- Xie B, Stessman D, Hart JH, Dong H, Wang Y, Wright DA, Nikolau BJ, Spalding MH, Halverson LJ** (2014) High-throughput fluorescence-activated cell sorting for lipid hyperaccumulating *Chlamydomonas reinhardtii* mutants. *Plant Biotechnol J* **12**: 872–882
- Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T** (2004) CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* **279**: 30490–30497
- Yamaguchi T, Osumi T** (2009) Chanarin-Dorfman syndrome: deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 519–523
- Yang H, Galea A, Sytnyk V, Crossley M** (2012a) Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol* **24**: 509–516
- Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, Yu J, Zhang P, Na H, Zhang H, et al** (2012b) The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* **53**: 1245–1253

- Yang Z, Ohlrogge JB** (2009) Turnover of Fatty Acids during Natural Senescence of Arabidopsis, Brachypodium, and Switchgrass and in Arabidopsis  $\beta$ -Oxidation Mutants. *Plant Physiol* **150**: 1981–1989
- Yaqoob P** (2003) Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol* **24**: 639–645
- Yeats TH, Rose JKC** (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol* **163**: 5–20
- Ytterberg AJ, Peltier J-B, Wijk KJ van** (2006) Protein Profiling of Plastoglobules in Chloroplasts and Chromoplasts. A Surprising Site for Differential Accumulation of Metabolic Enzymes. *Plant Physiol* **140**: 984–997
- Zappa F, Venditti R, Matteis MAD** (2017) TRAPPING Rab18 in lipid droplets. *EMBO J* e201696287
- Zhang P, Na H, Liu Z, Zhang S, Xue P, Chen Y, Pu J, Peng G, Huang X, Yang F, et al** (2012) Proteomic Study and Marker Protein Identification of *Caenorhabditis elegans* Lipid Droplets. *Mol Cell Proteomics* **11**: 317–328
- Zhang S, Wang Y, Cui L, Deng Y, Xu S, Yu J, Cichello S, Serrero G, Ying Y, Liu P** (2016) Morphologically and Functionally Distinct Lipid Droplet Subpopulations. *Sci Rep* **6**: 29539
- Zheng H, Rowland O, Kunst L** (2005) Disruptions of the Arabidopsis Enoyl-CoA Reductase Gene Reveal an Essential Role for Very-Long-Chain Fatty Acid Synthesis in Cell Expansion during Plant Morphogenesis. *Plant Cell* **17**: 1467–1481
- Zipfel C** (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 10–16
- Zipfel C, Felix G** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* **8**: 353–360
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–767
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The Arabidopsis *pxa1* Mutant Is Defective in an ATP-Binding Cassette Transporter-Like Protein Required for Peroxisomal Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation. *Plant Physiol* **127**: 1266–1278

Anexo

**Tabla S1. Proteoma de LDs de hojas senescentes**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Primary Gene Symbol  | Puntuación Mascot |      |      | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos Detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|------|------|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2   | R3   |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 1   | O22788       | AT2G33380 | Responsive to desiccation 20 (RD20/CLO3)                       | 2282              | 1974 | 1366 | 5622                 | 1874,0           | 13                  | 10 | 8  | 10,33          |
| 2   | Q9M0N1       | AT4G10790 | UBX domain-containing protein/PUX10                            | 920               | 587  | 1080 | 2587                 | 862,3            | 10                  | 8  | 13 | 10,33          |
| 3   | Q9FYF7       | AT1G67360 | LD-associated protein 1 (LDAP1)                                | 946               | 719  | 564  | 2229                 | 743,0            | 10                  | 10 | 8  | 9,33           |
| 4   | P31414       | AT1G15690 | Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1 (AVP1) | 635               | 636  | 833  | 2104                 | 701,3            | 11                  | 12 | 13 | 12,00          |
| 5   | Q07473       | AT5G01530 | Light harvesting complex photosystem II (LHCB4.1)              | 579               | 755  | 179  | 1513                 | 504,3            | 4                   | 4  | 3  | 3,67           |
| 6   | Q9LMM0       | AT1G01610 | Glycerol-3-phosphate sn-2-acyltransferase 4 (GPAT4)            | 549               | 257  | 685  | 1491                 | 497,0            | 13                  | 8  | 13 | 11,33          |
| 7   | A8MRW1       | AT2G45960 | Plasma membrane intrinsic protein 1b (PIP1b)                   | 582               | 481  | 411  | 1474                 | 491,3            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |
| 8   | P61837       | AT3G61430 | Plasma membrane intrinsic protein 1a (PIP1a)                   | 490               | 496  | 386  | 1372                 | 457,3            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |
| 9   | Q9XF89       | AT4G10340 | Light harvesting complex of photosystem II 5 (LHCB5)           | 413               | 495  | 197  | 1105                 | 368,3            | 7                   | 8  | 6  | 7,00           |
| 10  | P56777       | ATCG00680 | Photosystem II reaction center protein b (PSBb)                | 439               | 474  | 183  | 1096                 | 365,3            | 8                   | 8  | 5  | 7,00           |
| 11  | Q39196       | AT4G00430 | Plasma membrane intrinsic protein 1;4 (PIP1;4)                 | 321               | 471  | 284  | 1076                 | 358,7            | 5                   | 6  | 5  | 5,33           |
| 12  | Q8W4S4       | AT4G39080 | Vacuolar proton ATPase A3 (VHA-A3)                             | 466               | 403  | 202  | 1071                 | 357,0            | 11                  | 10 | 5  | 8,67           |
| 13  | P17745       | AT4G20360 | Rab GTPase homolog E1b (RABE1b)                                | 387               | 491  | 138  | 1016                 | 338,7            | 5                   | 8  | 2  | 5,00           |
| 14  | O03042       | ATCG00490 | Large subunit of RuBisCO (RBCL)                                | 408               | 91   | 513  | 1012                 | 337,3            | 12                  | 2  | 12 | 8,67           |
| 15  | Q08733       | AT1G01620 | Plasma membrane intrinsic protein 1c (PIP1c)                   | 351               | 369  | 276  | 996                  | 332,0            | 5                   | 5  | 5  | 5,00           |
| 16  | P56778       | ATCG00280 | Photosystem II reaction center protein c (PSBc)                | 278               | 516  | 192  | 986                  | 328,7            | 5                   | 7  | 5  | 5,67           |
| 17  | P43286       | AT3G53420 | Plasma membrane intrinsic protein 2a (PIP2a)                   | 271               | 383  | 322  | 976                  | 325,3            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |
| 18  | F4JIM7       | AT4G21150 | Hapless 6 (HAP6)   | 426               | 325  | 203  | 954                  | 318,0            | 9                   | 9  | 7  | 8,33           |
| 19  | Q9XIE2       | AT1G59870 | Penetration 3 (PEN3)   | 306               | 430  | 147  | 883                  | 294,3            | 11                  | 15 | 4  | 10,00          |
| 20  | Q944K2       | AT5G66680 | Defective glycosylation (DGL1)                                 | 324               | 379  | 169  | 872                  | 290,7            | 9                   | 9  | 6  | 8,00           |
| 21  | Q9LKR3       | AT5G28540 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a (BIP1) | 348               | 448  | 56   | 852                  | 284,0            | 9                   | 10 | 2  | 7,00           |
| 22  | Q9SVR1       | AT4G13160 | DUF593 (protein of unknown function/Zein-binding protein)      | 379               | 169  | 298  | 846                  | 282,0            | 6                   | 3  | 4  | 4,33           |
| 23  | P56771       | ATCG00540 | Photosynthetic electron transfer A (PETA)                      | 269               | 302  | 257  | 828                  | 276,0            | 9                   | 7  | 5  | 7,00           |
| 24  | Q9S7H1       | AT4G02770 | Photosystem I subunit D-1 (PSAD-1)                             | 313               | 311  | 201  | 825                  | 275,0            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |

**Tabla S1 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 25  | P83755       | ATCG00020 | Photosystem II reaction center protein A (PSBA)                        | 284               | 351 | 187 | 822                  | 274,0            | 6                   | 5  | 6  | 5,67           |
| 26  | Q9C8G5       | AT1G30360 | Early-responsive to dehydration 4 (ERD4)                               | 263               | 336 | 209 | 808                  | 269,3            | 8                   | 11 | 5  | 8,00           |
| 27  | Q9SRH6       | AT3G01290 | Hypersensitive induced reaction 2 (HIR4)                               | 210               | 387 | 199 | 796                  | 265,3            | 5                   | 8  | 6  | 6,33           |
| 28  | O23654       | AT1G78900 | Vacuolar ATP synthase subunit A (VHA-A)                                | 366               | 325 | 88  | 779                  | 259,7            | 9                   | 10 | 2  | 7,00           |
| 29  | Q9CAR7       | AT1G69840 | Hypersensitive induced reaction 1 (ATHIR1)                             | 208               | 342 | 225 | 775                  | 258,3            | 5                   | 7  | 6  | 6,00           |
| 30  | P56761       | ATCG00270 | Photosystem II reaction center protein D (PSBD)                        | 330               | 294 | 143 | 767                  | 255,7            | 4                   | 5  | 2  | 3,67           |
| 31  | Q9STF2       | AT3G46780 | Plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)                           | 318               | 298 | 124 | 740                  | 246,7            | 9                   | 8  | 4  | 7,00           |
| 32  | F4K873       | AT5G14740 | Carbonic anhydrase 2 (CA2)   | 257               | 222 | 231 | 710                  | 236,7            | 4                   | 5  | 5  | 4,67           |
| 33  | P56767       | ATCG00340 | Photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2 (PSAB)                  | 303               | 220 | 186 | 709                  | 236,3            | 5                   | 4  | 6  | 5,00           |
| 34  | F4IFM6       | AT2G20990 | Synaptotagmin A (SYTA)   | 205               | 346 | 139 | 690                  | 230,0            | 5                   | 7  | 5  | 5,67           |
| 35  | Q8LAA6       | AT4G23400 | Plasma membrane intrinsic protein 1;5 (PIP1;5)                         | 235               | 243 | 161 | 639                  | 213,0            | 5                   | 4  | 2  | 3,67           |
| 36  | Q9LMQ2       | AT1G15820 | Light harvesting complex photosystem II subunit 6 (LHCB6)              | 236               | 241 | 142 | 619                  | 206,3            | 3                   | 4  | 3  | 3,33           |
| 37  | F4IVZ7       | AT2G39730 | Rubisco activase (RCA)   | 265               | 204 | 116 | 585                  | 195,0            | 5                   | 5  | 5  | 5,00           |
| 38  | P0DH99       | AT1G07940 | GTP binding elongation factor Tu family protein                        | 191               | 277 | 88  | 556                  | 185,3            | 5                   | 4  | 2  | 3,67           |
| 39  | Q9FFC9       | AT5G16550 | Unknown lipid droplet protein/Lipid Droplet Interacting Protein (LDIP) | 221               | 143 | 185 | 549                  | 183,0            | 4                   | 2  | 3  | 3,00           |
| 40  | P93004       | AT4G35100 | Plasma membrane intrinsic protein 3 (PIP3)                             | 233               | 166 | 132 | 531                  | 177,0            | 3                   | 3  | 2  | 2,67           |
| 41  | P56757       | ATCG00120 | ATP synthase subunit alpha (ATPa)                                      | 252               | 189 | 90  | 531                  | 177,0            | 9                   | 8  | 3  | 6,67           |
| 43  | Q9SHC8       | AT2G45140 | Plant VAP homolog 12 (PVA12)   | 196               | 225 | 84  | 505                  | 168,3            | 3                   | 4  | 2  | 3,00           |
| 44  | Q9CAX6       | AT3G11510 | Ribosomal protein S11 family protein                                   | 189               | 219 | 97  | 505                  | 168,3            | 3                   | 3  | 3  | 3,00           |
| 42  | P0CJ48       | AT1G29920 | Chlorophyll a/b-binding protein 2 (CAB2)                               | 130               | 178 | 197 | 505                  | 168,3            | 4                   | 4  | 4  | 4,00           |
| 45  | Q9S831       | AT4G28750 | PSA e1 knockout (PSAe-1)   | 176               | 158 | 146 | 480                  | 160,0            | 3                   | 3  | 2  | 2,67           |
| 46  | Q9S7J7       | AT2G05070 | Photosystem II light harvesting complex gene 2.2 (LHCB2.2)             | 105               | 158 | 212 | 475                  | 158,3            | 4                   | 4  | 4  | 4,00           |
| 47  | P27521       | AT3G47470 | Light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4 (LHCA4)      | 243               | 97  | 126 | 466                  | 155,3            | 5                   | 2  | 2  | 3,00           |
| 48  | P56766       | ATCG00350 | Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 (PSAA)                  | 170               | 193 | 100 | 463                  | 154,3            | 7                   | 6  | 4  | 5,67           |
| 49  | P19366       | ATCG00480 | ATP synthase subunit beta (PB)   | 137               | 197 | 101 | 435                  | 145,0            | 3                   | 6  | 3  | 4,00           |
| 50  | P31167       | AT3G08580 | ADP/ATP carrier 1 (AAC1)   | 101               | 157 | 137 | 395                  | 131,7            | 4                   | 6  | 6  | 5,33           |

**Tabla S1 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína  | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|---|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |   | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 51  | P25857       | AT1G42970 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase b subunit (GAPB)           | 96                | 131 | 168 | 395                  | 131,7            | 4                   | 4  | 7  | 5,00           |
| 52  | Q9FM19       | AT5G62740 | Hypersensitive-induced response protein 1 (HIR1)                    | 92                | 144 | 155 | 391                  | 130,3            | 3                   | 4  | 4  | 3,67           |
| 53  | P25856       | AT3G26650 | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase a subunit (GAPA)           | 95                | 174 | 107 | 376                  | 125,3            | 2                   | 5  | 5  | 4,00           |
| 54  | Q8L636       | AT1G53210 | Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger (NCL)                   | 133               | 126 | 113 | 372                  | 124,0            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 55  | Q9SUI4       | AT4G12800 | Photosystem I subunit L (PSAL)                                      | 125               | 153 | 83  | 361                  | 120,3            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 56  | Q9SEL6       | AT5G39510 | Shoot gravitropism 4 (SGR4)   | 111               | 116 | 113 | 340                  | 113,3            | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 57  | Q501E6       | AT5G25250 | Flotillin 1 (FLOT1)   | 119               | 133 | 84  | 336                  | 112,0            | 4                   | 4  | 3  | 3,67           |
| 58  | Q9ZSD4       | AT3G11820 | Syntaxin of plants 121 (SYP121)                                     | 113               | 137 | 66  | 316                  | 105,3            | 3                   | 5  | 2  | 3,33           |
| 59  | O04309       | AT3G16470 | Jasmonate responsive 1 (JR1)  | 107               | 129 | 74  | 310                  | 103,3            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 60  | Q9LTL0       | AT3G26290 | Cytochrome P450, family 71, subfamily b, polypeptide 26 (CYP71B26)  | 107               | 126 | 71  | 304                  | 101,3            | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 61  | Q9M2D8       | AT3G61260 | Remorin family protein  | 55                | 144 | 95  | 294                  | 98,0             | 2                   | 5  | 3  | 3,33           |
| 62  | Q9ZQ87       | AT2G03510 | SPFH/Band 7/PHB domain containig membrane-associated protein family | 126               | 86  | 81  | 293                  | 97,7             | 3                   | 3  | 3  | 3,00           |
| 63  | P93014       | AT2G33800 | Scabra 1 (SCA1)   | 151               | 84  | 57  | 292                  | 97,3             | 4                   | 2  | 2  | 2,67           |
| 64  | Q42139       | AT4G32260 | Pigment defective 334 (PDE334)                                      | 79                | 157 | 55  | 291                  | 97,0             | 3                   | 4  | 2  | 3,00           |
| 65  | P56759       | ATCG00130 | ATPase family F subunit (ATPF)                                      | 91                | 107 | 61  | 259                  | 86,3             | 3                   | 4  | 2  | 3,00           |
| 66  | F411B4       | AT1G22280 | Phytochrome-associated protein phosphatase type 2c (PAPP2c)         | 67                | 94  | 93  | 254                  | 84,7             | 2                   | 2  | 3  | 2,33           |
| 67  | Q9SHE8       | AT1G31330 | Photosystem I subunit F (PSAF)                                      | 86                | 106 | 60  | 252                  | 84,0             | 3                   | 3  | 2  | 2,67           |
| 68  | F4JXE8       | AT5G59960 | K-stimulated pyrophosphate-energized sodium pump protein            | 102               | 92  | 56  | 250                  | 83,3             | 4                   | 4  | 2  | 3,33           |
| 69  | Q94CE4       | AT1G70410 | Beta carbonic anhydrase 4 (BCA4)                                    | 76                | 80  | 88  | 244                  | 81,3             | 2                   | 2  | 3  | 2,33           |
| 70  | Q9LJG3       | AT3G14210 | Epithiospecifier modifier 1 (ESM1)                                  | 93                | 87  | 59  | 239                  | 79,7             | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 71  | Q8VZ95       | AT3G60600 | VAMP/synaptobrevin-associated protein 27-1 (VAP27-1)                | 90                | 66  | 50  | 206                  | 68,7             | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 72  | Q9SDS7       | AT1G12840 | De-etiolated 3 (det3)   | 81                | 59  | 59  | 199                  | 66,3             | 2                   | 3  | 3  | 2,67           |

**Tabla S2. Proteoma de LDs de hojas infectadas con *Pseudomonas* 24 hpi**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |      |      | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|------|------|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2   | R3   |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 1   | O22788       | AT2G33380 | Responsive to desiccation 20 (RD20/CLO3)                       | 1576              | 1409 | 1040 | 4025                 | 1341,7           | 9                   | 10 | 8  | 9,00           |
| 2   | Q9M0N1       | AT4G10790 | UBX domain-containing protein/PUX10                            | 858               | 1229 | 1647 | 3734                 | 1244,7           | 10                  | 12 | 11 | 11,00          |
| 3   | P31414       | AT1G15690 | Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1 (AVP1) | 529               | 999  | 803  | 2331                 | 777,0            | 9                   | 15 | 11 | 11,67          |
| 4   | Q9LMM0       | AT1G01610 | Glycerol-3-phosphate sn-2-acyltransferase 4 (GPAT4)            | 721               | 317  | 279  | 1317                 | 439,0            | 17                  | 8  | 7  | 10,67          |
| 5   | A8MRW1       | AT2G45960 | Plasma membrane intrinsic protein 1b (PIP1b)                   | 381               | 424  | 401  | 1206                 | 402,0            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |
| 6   | P61837       | AT3G61430 | Plasma membrane intrinsic protein 1a (PIP1a)                   | 349               | 379  | 310  | 1038                 | 346,0            | 6                   | 5  | 5  | 5,33           |
| 7   | Q9SRH6       | AT3G01290 | Hypersensitive induced reaction 2 (HIR2)                       | 330               | 347  | 297  | 974                  | 324,7            | 11                  | 9  | 7  | 9,00           |
| 8   | Q5XF03       | AT4G00400 | Glycerol-3-phosphate sn-2-acyltransferase 8 (GPAT8)            | 505               | 235  | 234  | 974                  | 324,7            | 12                  | 5  | 6  | 7,67           |
| 9   | Q501E6       | AT5G25250 | Flotillin 1 (FLOT1)  | 231               | 383  | 349  | 963                  | 321,0            | 8                   | 7  | 7  | 7,33           |
| 10  | Q9FYF7       | AT1G67360 | LD-associated protein 1 (LDAP1)                                | 455               | 288  | 219  | 962                  | 320,7            | 8                   | 4  | 3  | 5,00           |
| 11  | F4IVZ7       | AT2G39730 | Rubisco activase (RCA)   | 279               | 428  | 203  | 910                  | 303,3            | 6                   | 8  | 5  | 6,33           |
| 12  | F4JIM7       | AT4G21150 | Hapless 6 (HAP6)   | 307               | 394  | 157  | 858                  | 286,0            | 9                   | 12 | 5  | 8,67           |
| 13  | O03042       | ATCG00490 | Large subunit of RuBisCO (RBCL)                                | 148               | 240  | 425  | 813                  | 271,0            | 5                   | 7  | 11 | 7,67           |
| 14  | Q944K2       | AT5G66680 | Defective glycosylation (DGL1)                                 | 268               | 260  | 248  | 776                  | 258,7            | 8                   | 7  | 7  | 7,33           |
| 15  | Q9MA63       | AT3G05500 | LD-associated protein 3 (LDAP3)                                | 230               | 323  | 222  | 775                  | 258,3            | 7                   | 8  | 5  | 6,67           |
| 16  | Q9FJF1       | AT5G59840 | Ras-related small GTP-binding family protein                   | 208               | 233  | 323  | 764                  | 254,7            | 7                   | 5  | 5  | 5,67           |
| 17  | P20649       | AT2G18960 | H <sup>+</sup> -ATPase 1 (HA1)                                 | 244               | 256  | 252  | 752                  | 250,7            | 7                   | 10 | 8  | 8,33           |
| 18  | Q39196       | AT4G00430 | Plasma membrane intrinsic protein 1;4 (PIP1;4)                 | 232               | 277  | 241  | 750                  | 250,0            | 6                   | 5  | 5  | 5,33           |
| 19  | Q8W4S4       | AT4G39080 | Vacuolar proton ATPase a3 (VHA-a3)                             | 243               | 290  | 215  | 748                  | 249,3            | 5                   | 6  | 4  | 5,00           |
| 20  | Q08733       | AT1G01620 | Plasma membrane intrinsic protein 1c (PIP1c)                   | 183               | 282  | 257  | 722                  | 240,7            | 4                   | 5  | 5  | 4,67           |
| 21  | Q9XIE2       | AT1G59870 | Penetration 3 (PEN3)   | 211               | 350  | 147  | 708                  | 236,0            | 7                   | 11 | 5  | 7,67           |
| 22  | P92994       | AT2G30490 | Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)                                  | 232               | 294  | 158  | 684                  | 228,0            | 7                   | 9  | 4  | 6,67           |
| 23  | P56777       | ATCG00680 | Photosystem II reaction center protein b (PSBb)                | 183               | 239  | 218  | 640                  | 213,3            | 5                   | 6  | 5  | 5,33           |
| 24  | Q9LKR3       | AT5G28540 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a (BIP1) | 233               | 242  | 162  | 637                  | 212,3            | 6                   | 7  | 5  | 6,00           |



**Tabla S2 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína  | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|---|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |   | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 25  | P0CJ48       | AT1G29920 | Chlorophyll a/b-binding protein 2 (CAB2)                  | 231               | 218 | 170 | 619                  | 206,3            | 3                   | 4  | 3  | 3,33           |
| 26  | P43286       | AT3G53420 | Plasma membrane intrinsic protein 2a (PIP2a)              | 241               | 187 | 182 | 610                  | 203,3            | 4                   | 6  | 3  | 4,33           |
| 27  | P93004       | AT4G35100 | Plasma membrane intrinsic protein 3 (PIP3)                | 288               | 137 | 183 | 608                  | 202,7            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 28  | Q70E96       | AT4G36250 | Aldehyde dehydrogenase 3F1 (ALDH3F1)                      | 319               | 145 | 115 | 579                  | 193,0            | 11                  | 3  | 3  | 5,67           |
| 29  | Q9SGH6       | AT3G01420 | $\alpha$ -Dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX1)                   | 217               | 228 | 130 | 575                  | 191,7            | 6                   | 6  | 4  | 5,33           |
| 30  | P83755       | ATCG00020 | Photosystem II reaction center protein a (PSBA)           | 122               | 270 | 182 | 574                  | 191,3            | 3                   | 5  | 2  | 3,33           |
| 31  | Q9XF89       | AT4G10340 | Light harvesting complex of photosystem II 5 (LHCB5)      | 249               | 191 | 133 | 573                  | 191,0            | 5                   | 5  | 4  | 4,67           |
| 32  | Q07473       | AT5G01530 | Light harvesting complex photosystem II (LHCB4.1)         | 219               | 202 | 131 | 552                  | 184,0            | 3                   | 3  | 3  | 3,00           |
| 33  | Q8LAA6       | AT4G23400 | Plasma membrane intrinsic protein 1;5 (PIP1;5)            | 240               | 193 | 115 | 548                  | 182,7            | 5                   | 3  | 2  | 3,33           |
| 34  | Q9FPJ4       | AT5G47200 | Rab GTPase homolog 1a (RAB1a)                             | 185               | 121 | 197 | 503                  | 167,7            | 5                   | 4  | 5  | 4,67           |
| 35  | Q9CAR7       | AT1G69840 | Hypersensitive induced reaction 1 (ATHIR1)                | 122               | 176 | 201 | 499                  | 166,3            | 6                   | 5  | 5  | 5,33           |
| 36  | P56757       | ATCG00120 | ATP synthase subunit alpha (ATPa)                         | 104               | 217 | 147 | 468                  | 156,0            | 3                   | 4  | 4  | 3,67           |
| 37  | Q9SHC8       | AT2G45140 | Plant VAP homolog 12 (PVA12)                              | 172               | 148 | 127 | 447                  | 149,0            | 3                   | 3  | 4  | 3,33           |
| 38  | P56778       | ATCG00280 | Photosystem II reaction center protein C (PSBC)           | 116               | 139 | 180 | 435                  | 145,0            | 3                   | 5  | 4  | 4,00           |
| 39  | Q8VZ95       | AT3G60600 | VAMP/synaptobrevin-associated protein 27-1 (VAP27-1)      | 159               | 154 | 117 | 430                  | 143,3            | 6                   | 4  | 4  | 4,67           |
| 40  | Q9S7H1       | AT4G02770 | Photosystem I subunit D-1 (PSAD-1)                        | 164               | 154 | 100 | 418                  | 139,3            | 4                   | 5  | 3  | 4,00           |
| 41  | P56771       | ATCG00540 | Photosynthetic electron transfer a (PETA)                 | 142               | 111 | 130 | 383                  | 127,7            | 4                   | 3  | 4  | 3,67           |
| 42  | Q9SVC2       | AT3G52400 | Syntaxin of plants 122 (SYP122)                           | 79                | 148 | 150 | 377                  | 125,7            | 2                   | 3  | 3  | 2,67           |
| 43  | P29402       | AT5G61790 | Calnexin 1 (CNX1)   | 130               | 129 | 112 | 371                  | 123,7            | 4                   | 3  | 5  | 4,00           |
| 44  | P56761       | ATCG00270 | Photosystem II reaction center protein D (PSBD)           | 106               | 125 | 139 | 370                  | 123,3            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 45  | P31167       | AT3G08580 | ADP/ATP carrier 1 (AAC1)                                  | 97                | 188 | 82  | 367                  | 122,3            | 4                   | 7  | 2  | 4,33           |
| 46  | Q9LW27       | AT3G26830 | Phytoalexin deficient 3 (PAD3)                            | 126               | 148 | 82  | 356                  | 118,7            | 4                   | 6  | 3  | 4,33           |
| 47  | Q9LS94       | AT3G18820 | Rab GTPase homolog G3f (RAB7b)                            | 100               | 107 | 141 | 348                  | 116,0            | 3                   | 3  | 5  | 3,67           |
| 48  | O04309       | AT3G16470 | Jasmonate Responsive 1 (JR1)                              | 158               | 76  | 97  | 331                  | 110,3            | 4                   | 2  | 3  | 3,00           |
| 49  | Q8L636       | AT1G53210 | Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger (NCL)         | 112               | 93  | 123 | 328                  | 109,3            | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 50  | Q9LMQ2       | AT1G15820 | Light harvesting complex photosystem II subunit 6 (LHCB6) | 90                | 173 | 53  | 316                  | 105,3            | 2                   | 4  | 2  | 2,67           |

**Tabla S2 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 51  | Q39085       | AT3G19820 | Dwarf 1 (DWF1)   | 120               | 103 | 93  | 316                  | 105,3            | 3                   | 3  | 3  | 3,00           |
| 52  | F4I5X3       | AT1G10740 | $\alpha/\beta$ hydrolases superfamily proteins                     | 123               | 95  | 96  | 314                  | 104,7            | 4                   | 4  | 2  | 3,33           |
| 53  | Q96283       | AT3G46830 | Rab GTPase homolog A2C (RABA2c)                                    | 90                | 96  | 121 | 307                  | 102,3            | 3                   | 3  | 4  | 3,33           |
| 54  | O49342       | AT2G30770 | Cytochrome P450, family 71, subfamily a, polypeptide 13 (CYP71A13) | 171               | 78  | 55  | 304                  | 101,3            | 4                   | 4  | 2  | 3,33           |
| 55  | Q9STF2       | AT3G46780 | Plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)                       | 95                | 129 | 79  | 303                  | 101,0            | 2                   | 4  | 2  | 2,67           |
| 56  | Q9ZUA0       | AT2G01720 | Ribophorin I   | 77                | 155 | 66  | 298                  | 99,3             | 3                   | 5  | 2  | 3,33           |
| 57  | Q9SE50       | AT1G52400 | Beta glucosidase 18 (BGLU18)                                       | 197               | 53  | 45  | 295                  | 98,3             | 6                   | 2  | 2  | 3,33           |
| 58  | Q9SVR1       | AT4G13160 | DUF593 (protein of unknown function/Zein-binding protein           | 106               | 111 | 76  | 293                  | 97,7             | 3                   | 3  | 2  | 2,67           |
| 59  | O23657       | AT1G43890 | Rab GTPase homolog B18 (RAB18)                                     | 49                | 82  | 161 | 292                  | 97,3             | 2                   | 2  | 4  | 2,67           |
| 60  | Q9SHE8       | AT1G31330 | Photosystem I subunit f (PSAF)                                     | 59                | 129 | 102 | 290                  | 96,7             | 2                   | 3  | 3  | 2,67           |
| 61  | Q9CAX6       | AT3G11510 | Ribosomal protein S11 family protein                               | 120               | 73  | 97  | 290                  | 96,7             | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 62  | O48832       | AT2G17840 | Early-responsive to dehydration 7 (ERD7)                           | 98                | 113 | 75  | 286                  | 95,3             | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 63  | P56759       | ATCG00130 | ATPase family subunit F (ATPF)                                     | 62                | 117 | 86  | 265                  | 88,3             | 2                   | 4  | 2  | 2,67           |
| 64  | Q94CE4       | AT1G70410 | Beta carbonic anhydrase 4 (BCA4)                                   | 75                | 67  | 107 | 249                  | 83,0             | 3                   | 3  | 3  | 3,00           |
| 65  | Q9C8G5       | AT1G30360 | Early-responsive to dehydration 4 (ERD4)                           | 94                | 96  | 58  | 248                  | 82,7             | 3                   | 4  | 2  | 3,00           |
| 66  | Q9M2U2       | AT3G55360 | Eceriferum 10 (CER10)  | 86                | 91  | 54  | 231                  | 77,0             | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 67  | P25856       | AT3G26650 | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase a subunit (GAPA)          | 56                | 78  | 70  | 204                  | 68,0             | 2                   | 3  | 3  | 2,67           |
| 68  | P56766       | ATCG00350 | Photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A1 (PSAA)              | 67                | 70  | 65  | 202                  | 67,3             | 3                   | 3  | 3  | 3,00           |
| 69  | Q9SUR3       | AT4G23630 | VIRB2-interacting protein 1 (BTI1)                                 | 60                | 74  | 54  | 188                  | 62,7             | 2                   | 4  | 2  | 2,67           |
| 70  | Q8RWJ5       | AT1G29310 | Putative uncharacterized protein                                   | 57                | 65  | 41  | 163                  | 54,3             | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |

**Tabla S3. Proteoma de LDs de hojas infectadas con *Pseudomonas* 72 hpi**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |      |      | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|------|------|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2   | R3   |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 1   | O22788       | AT2G33380 | Responsive to desiccation 20 (RD20/CLO3)                       | 2809              | 3952 | 3262 | 10023                | 3341,0           | 13                  | 15 | 17 | 15,00          |
| 2   | Q9M0N1       | AT4G10790 | UBX domain-containing protein/PUX10                            | 972               | 957  | 1992 | 3921                 | 1307,0           | 13                  | 12 | 15 | 13,33          |
| 3   | P31414       | AT1G15690 | Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1 (AVP1) | 994               | 777  | 1008 | 2779                 | 926,3            | 16                  | 13 | 17 | 15,33          |
| 4   | Q8W4S4       | AT4G39080 | Vacuolar proton ATPase a3 (VHA-a3)                             | 649               | 515  | 857  | 2021                 | 673,7            | 14                  | 12 | 15 | 13,67          |
| 5   | Q501E6       | AT5G25250 | Flotillin 1 (FLOT1)  | 586               | 503  | 610  | 1699                 | 566,3            | 13                  | 12 | 15 | 13,33          |
| 6   | A8MRW1       | AT2G45960 | Plasma membrane intrinsic protein 1b (PIP1b)                   | 523               | 432  | 550  | 1505                 | 501,7            | 5                   | 5  | 5  | 5,00           |
| 7   | Q9SRH6       | AT3G01290 | Hypersensitive induced reaction 2 (HIR2)                       | 514               | 459  | 465  | 1438                 | 479,3            | 12                  | 12 | 11 | 11,67          |
| 8   | Q4V3D6       | AT5G25260 | Flotillin 2 (FLOT2)  | 434               | 478  | 477  | 1389                 | 463,0            | 11                  | 11 | 12 | 11,33          |
| 9   | Q9XIE2       | AT1G59870 | Penetration 3 (PEN3)   | 363               | 378  | 567  | 1308                 | 436,0            | 11                  | 11 | 17 | 13,00          |
| 10  | P61837       | AT3G61430 | Plasma membrane intrinsic protein 1a (PIP1a)                   | 408               | 438  | 458  | 1304                 | 434,7            | 5                   | 5  | 5  | 5,00           |
| 11  | Q9LKR3       | AT5G28540 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a (BIP1) | 449               | 193  | 527  | 1169                 | 389,7            | 12                  | 7  | 17 | 12,00          |
| 12  | Q9FYF7       | AT1G67360 | LD-associated protein 1 (LDAP1)                                | 291               | 370  | 482  | 1143                 | 381,0            | 7                   | 7  | 8  | 7,33           |
| 13  | Q39196       | AT4G00430 | plasma membrane intrinsic protein 1;4 (pip1;4)                 | 343               | 370  | 403  | 1116                 | 372,0            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |
| 14  | Q9M9E1       | AT1G15520 | ATP-binding cassette G40 (ABCG40)                              | 458               | 248  | 396  | 1102                 | 367,3            | 11                  | 8  | 12 | 10,33          |
| 15  | Q9SGH6       | AT3G01420 | $\alpha$ -Dioxigenasa ( $\alpha$ DOX1)                         | 346               | 173  | 583  | 1102                 | 367,3            | 8                   | 6  | 14 | 9,33           |
| 16  | F4JIM7       | AT4G21150 | Hapless 6 (HAP6)   | 384               | 326  | 383  | 1093                 | 364,3            | 8                   | 6  | 11 | 8,33           |
| 17  | P20649       | AT2G18960 | H <sup>+</sup> -ATPase 1 (HA1)                                 | 402               | 245  | 421  | 1068                 | 356,0            | 13                  | 8  | 14 | 11,67          |
| 18  | F4IVZ7       | AT2G39730 | Rubisco activase (RCA)   | 398               | 310  | 359  | 1067                 | 355,7            | 9                   | 6  | 6  | 7,00           |
| 19  | P17745       | AT4G20360 | Rab GTPase homolog e1b (RAB1b)                                 | 371               | 212  | 421  | 1004                 | 334,7            | 6                   | 3  | 10 | 6,33           |
| 20  | P25856       | AT3G26650 | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase a subunit (GAPA)      | 504               | 139  | 335  | 978                  | 326,0            | 9                   | 5  | 8  | 7,33           |
| 21  | P43286       | AT3G53420 | Plasma membrane intrinsic protein 2a (PIP2a)                   | 316               | 290  | 364  | 970                  | 323,3            | 6                   | 6  | 6  | 6,00           |
| 22  | F4JPJ7       | AT4G30190 | H <sup>+</sup> -ATPase 2 (HA2)                                 | 365               | 216  | 339  | 920                  | 306,7            | 10                  | 7  | 11 | 9,33           |
| 23  | Q9LMM0       | AT1G01610 | Glycerol-3-phosphate sn-2-acyltransferase 4 (GPAT4)            | 292               | 188  | 432  | 912                  | 304,0            | 6                   | 4  | 12 | 7,33           |
| 24  | O80948       | AT2G39330 | Jacalin-related lectin 23 (JAL23)                              | 163               | 366  | 341  | 870                  | 290,0            | 4                   | 7  | 8  | 6,33           |

**Tabla S3 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 25  | Q944K2       | AT5G66680 | Defective glycosylation (DGL1)                                     | 258               | 224 | 382 | 864                  | 288,0            | 5                   | 6  | 9  | 6,67           |
| 26  | Q08733       | AT1G01620 | Plasma membrane intrinsic protein 1c (PIP1c)                       | 244               | 267 | 346 | 857                  | 285,7            | 4                   | 5  | 5  | 4,67           |
| 27  | O23654       | AT1G78900 | Vacuolar ATP synthase subunit A (VHA-A)                            | 255               | 126 | 460 | 841                  | 280,3            | 5                   | 3  | 12 | 6,67           |
| 28  | Q9CAR7       | AT1G69840 | Hypersensitive induced reaction 1 (ATHIR1)                         | 269               | 261 | 229 | 759                  | 253,0            | 9                   | 8  | 6  | 7,67           |
| 29  | Q9C8G5       | AT1G30360 | Early-responsive to dehydration 4 (ERD4)                           | 128               | 252 | 331 | 711                  | 237,0            | 3                   | 6  | 7  | 5,33           |
| 30  | O04309       | AT3G16470 | Jasmonate responsive 1 (JR1)                                       | 178               | 247 | 275 | 700                  | 233,3            | 3                   | 5  | 4  | 4,00           |
| 31  | Q8LAA6       | AT4G23400 | Plasma membrane intrinsic protein 1;5 (PIP1;5)                     | 192               | 232 | 246 | 670                  | 223,3            | 4                   | 4  | 5  | 4,33           |
| 32  | F4J8V9       | AT3G18780 | Actin 2 (ACT2)   | 270               | 228 | 169 | 667                  | 222,3            | 7                   | 5  | 5  | 5,67           |
| 33  | Q9SVR1       | AT4G13160 | DUF593 (protein of unknown function/Zein-binding protein           | 159               | 238 | 209 | 606                  | 202,0            | 4                   | 5  | 4  | 4,33           |
| 34  | Q9SHC8       | AT2G45140 | Plant VAP homolog 12 (PVA12)                                       | 183               | 201 | 214 | 598                  | 199,3            | 4                   | 4  | 3  | 3,67           |
| 35  | Q9FM19       | AT5G62740 | Hypersensitive-induced response protein 1 (HIR1)                   | 222               | 154 | 220 | 596                  | 198,7            | 7                   | 6  | 7  | 6,67           |
| 36  | P31167       | AT3G08580 | ADP/ATP carrier 1 (AAC1)   | 214               | 164 | 196 | 574                  | 191,3            | 8                   | 5  | 6  | 6,33           |
| 37  | Q9STF2       | AT3G46780 | Plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)                       | 158               | 178 | 231 | 567                  | 189,0            | 5                   | 7  | 4  | 5,33           |
| 38  | P0DH99       | AT1G07940 | Elongation factor1-alpha 3   | 218               | 133 | 200 | 551                  | 183,7            | 5                   | 3  | 6  | 4,67           |
| 39  | P25857       | AT1G42970 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase b subunit (gapb)          | 153               | 162 | 233 | 548                  | 182,7            | 4                   | 5  | 6  | 5,00           |
| 40  | Q8RUC6       | AT2G35635 | Ubiquitin 7 (UBQ7)   | 262               | 89  | 194 | 545                  | 181,7            | 3                   | 4  | 5  | 4,00           |
| 41  | Q9FNH6       | AT5G06320 | NDR1/HIN1-like 3 (NHL3)  | 212               | 184 | 122 | 518                  | 172,7            | 4                   | 3  | 3  | 3,33           |
| 42  | O03042       | ATCG00490 | Large subunit of RuBisCO(rbcL)                                     | 226               | 147 | 140 | 513                  | 171,0            | 7                   | 4  | 5  | 5,33           |
| 43  | P93004       | AT4G35100 | Plasma membrane intrinsic protein 3 (PIP3)                         | 173               | 102 | 219 | 494                  | 164,7            | 2                   | 2  | 3  | 2,33           |
| 44  | F4IFM6       | AT2G20990 | Synaptotagmin A (SYTA)   | 103               | 215 | 164 | 482                  | 160,7            | 3                   | 5  | 5  | 4,33           |
| 45  | P56757       | ATCG00120 | ATP synthase subunit alpha (ATPa)                                  | 162               | 151 | 165 | 478                  | 159,3            | 5                   | 4  | 4  | 4,33           |
| 46  | P29402       | AT5G61790 | Calnexin 1 (CNX1)  | 181               | 115 | 180 | 476                  | 158,7            | 3                   | 2  | 6  | 3,67           |
| 47  | Q9ZSD4       | AT3G11820 | Syntaxin of plants 121 (SYP121)                                    | 122               | 168 | 168 | 458                  | 152,7            | 3                   | 3  | 4  | 3,33           |
| 48  | O49340       | AT2G30750 | Cytochrome P450, family 71, subfamily a, polypeptide 12 (CYP71A12) | 195               | 133 | 124 | 452                  | 150,7            | 5                   | 3  | 4  | 4,00           |
| 49  | F4JXW9       | AT5G11560 | PQQ-DH domain containing protein                                   | 94                | 151 | 206 | 451                  | 150,3            | 2                   | 4  | 5  | 3,67           |
| 50  | P56778       | ATCG00280 | Photosystem II reaction center protein C (PSBC)                    | 117               | 98  | 235 | 450                  | 150,0            | 2                   | 2  | 6  | 3,33           |

**Tabla S3 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 51  | Q9ZQ87       | AT2G03510 | SPFH/Band 7/PHB domain containig membrane-associated protein family  | 117               | 177 | 151 | 445                  | 148,3            | 4                   | 6  | 5  | 5,00           |
| 52  | P92994       | AT2G30490 | Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)  | 163               | 114 | 156 | 433                  | 144,3            | 4                   | 3  | 4  | 3,67           |
| 53  | Q9SMX3       | AT5G15090 | Voltage dependent anion channel 3 (VDAC3)  | 100               | 73  | 260 | 433                  | 144,3            | 3                   | 2  | 6  | 3,67           |
| 54  | F4KG21       | AT5G46110 | Acclimation of photosynthesis to environment 2 (APE2)  | 151               | 84  | 196 | 431                  | 143,7            | 4                   | 3  | 4  | 3,67           |
| 55  | Q9FFC9       | AT5G16550 | Unknown lipid droplet protein/Lipid Droplet Interacting Protein (LDIP)   | 162               | 104 | 164 | 430                  | 143,3            | 2                   | 3  | 3  | 2,67           |
| 56  | Q8GXS3       | AT4G25550 | Pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit 2   | 97                | 156 | 164 | 417                  | 139,0            | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 57  | Q9FHM7       | AT5G51570 | SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family/Hypersensitive-induced response protein 4 | 147               | 70  | 198 | 415                  | 138,3            | 4                   | 2  | 6  | 4,00           |
| 58  | Q02972       | AT4G37990 | Elicitor-activated gene 3-2 (ELI3-2)   | 170               | 90  | 140 | 400                  | 133,3            | 3                   | 2  | 3  | 2,67           |
| 59  | P19366       | ATCG00480 | ATP synthase subunit beta (PB)   | 123               | 103 | 167 | 393                  | 131,0            | 3                   | 3  | 5  | 3,67           |
| 60  | F4HQT1       | AT1G13440 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 (GAPC2)  | 203               | 52  | 129 | 384                  | 128,0            | 3                   | 2  | 4  | 3,00           |
| 61  | P43287       | AT2G37170 | Plasma membrane intrinsic protein 2 (PIP2b)  | 111               | 122 | 144 | 377                  | 125,7            | 3                   | 4  | 5  | 4,00           |
| 62  | F4JXE8       | AT5G59960 | K-stimulated pyrophosphate-energized sodium pump protein   | 79                | 104 | 177 | 360                  | 120,0            | 3                   | 3  | 5  | 3,67           |
| 63  | Q9SRH5       | AT3G01280 | Voltage dependent anion channel 1 (VDAC1)  | 86                | 100 | 166 | 352                  | 117,3            | 2                   | 2  | 4  | 2,67           |
| 64  | Q9SVC2       | AT3G52400 | Syntaxin of plants 122 (SYP122)  | 84                | 160 | 106 | 350                  | 116,7            | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 65  | P43297       | AT1G47128 | Responsive to dehydration 21A (RD21a)  | 76                | 72  | 195 | 343                  | 114,3            | 3                   | 2  | 5  | 3,33           |
| 66  | Q9LW27       | AT3G26830 | Phytoalexin deficient 3 (PAD3)   | 151               | 123 | 66  | 340                  | 113,3            | 6                   | 7  | 2  | 5,00           |
| 67  | Q9LS01       | AT3G25780 | Allene oxide cyclase 3 (AOC3)  | 146               | 111 | 81  | 338                  | 112,7            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 68  | Q9ZV24       | AT2G28900 | Outer plastid envelope protein 16-1 (OEP16-1)  | 124               | 123 | 89  | 336                  | 112,0            | 3                   | 2  | 3  | 2,67           |
| 69  | Q9LI61       | AT3G30390 | Amino acid transporter AVT6A   | 118               | 102 | 93  | 313                  | 104,3            | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 70  | Q9FMF7       | AT5G64290 | Dicarboxylate transport 2.1 (DIT2.1)   | 97                | 79  | 127 | 303                  | 101,0            | 3                   | 2  | 3  | 2,67           |
| 71  | Q9SHE8       | AT1G31330 | Photosystem I subunit F (PSAF)   | 50                | 65  | 187 | 302                  | 100,7            | 2                   | 2  | 4  | 2,67           |
| 72  | Q9SK50       | AT2G24820 | Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 55-II (TIC55-II)                                     | 67                | 56  | 165 | 288                  | 96,0             | 2                   | 2  | 8  | 4,00           |
| 73  | Q39085       | AT3G19820 | Dwarf 1 (DW11)   | 66                | 69  | 141 | 276                  | 92,0             | 2                   | 2  | 3  | 2,33           |
| 74  | F4I1B4       | AT1G22280 | Phytochrome-associated protein phosphatase type 2C (PAPP2C)  | 61                | 96  | 96  | 253                  | 84,3             | 2                   | 3  | 3  | 2,67           |
| 75  | Q8VZ95       | AT3G60600 | VAMP/synaptobrevin-associated protein 27-1 (VAP27-1)   | 109               | 87  | 54  | 250                  | 83,3             | 3                   | 3  | 2  | 2,67           |

**Tabla S3 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |    |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2 | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 76  | Q9SSR2       | AT1G52600 | Peptidase S24/S26A/S26B/S26C                                       | 89                | 80 | 73  | 242                  | 80,7             | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 77  | Q9M2L4       | AT3G57330 | Autoinhibited Ca <sup>2+</sup> -ATPase 11 (ACA11)                  | 48                | 62 | 125 | 235                  | 78,3             | 2                   | 2  | 3  | 2,33           |
| 78  | O65787       | AT2G24180 | Cytochrome P450 71B6 (CYP71B6)                                     | 107               | 78 | 48  | 233                  | 77,7             | 4                   | 3  | 2  | 3,00           |
| 79  | Q9SAE4       | AT1G13100 | Cytochrome P450, family 71, subfamily b, polypeptide 29 (CYP71B29) | 63                | 70 | 75  | 208                  | 69,3             | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 80  | Q9SDS7       | AT1G12840 | De-etiolated 3 (DET3)  | 61                | 62 | 71  | 194                  | 64,7             | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 81  | O81108       | AT4G37640 | Calcium ATPase 2 (ACA2)  | 50                | 55 | 55  | 160                  | 53,3             | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |

**Tabla S4. Proteínas comunes a los 3 proteomas**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot senescencia |      |      | Puntuación Mascot 24 hpi |      |      | Puntuación Mascot 72hpi |      |      | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados 6 semanas |    |    | Péptidos detectados 24 hpi |    |    | Péptidos detectados 72hpi |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------------------|------|------|--------------------------|------|------|-------------------------|------|------|----------------------|------------------|-------------------------------|----|----|----------------------------|----|----|---------------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                            | R2   | R3   | R1                       | R2   | R3   | R1                      | R2   | R3   |                      |                  | R1                            | R2 | R3 | R1                         | R2 | R3 | R1                        | R2 | R3 |                |
| 1   | O22788       | AT2G33380 | Responsive to desiccation 20 (RD20/CLO3)                       | 2282                          | 1974 | 1366 | 1576                     | 1409 | 1040 | 2809                    | 3952 | 3262 | 19670                | 2185,6           | 13                            | 10 | 13 | 9                          | 10 | 8  | 13                        | 15 | 17 | 12,00          |
| 2   | Q9M0N1       | AT4G10790 | UBX domain-containing protein/PUX10                            | 920                           | 587  | 1080 | 858                      | 1229 | 1647 | 972                     | 957  | 1992 | 10242                | 1138,0           | 10                            | 8  | 10 | 10                         | 12 | 11 | 13                        | 12 | 15 | 11,22          |
| 3   | P31414       | AT1G15690 | Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1 (AVP1) | 635                           | 636  | 833  | 529                      | 999  | 803  | 994                     | 777  | 1008 | 7214                 | 801,6            | 11                            | 12 | 11 | 9                          | 15 | 11 | 16                        | 13 | 17 | 12,78          |
| 4   | Q9FYF7       | AT1G67360 | LD-associated protein 1 (LDAP1)                                | 946                           | 719  | 564  | 455                      | 288  | 219  | 291                     | 370  | 482  | 4334                 | 481,6            | 10                            | 10 | 10 | 8                          | 4  | 3  | 7                         | 7  | 8  | 7,44           |
| 5   | A8MRW1       | AT2G45960 | Plasma membrane intrinsic protein 1b (PIP1b)                   | 582                           | 481  | 411  | 381                      | 424  | 401  | 523                     | 432  | 550  | 4185                 | 465,0            | 6                             | 6  | 6  | 6                          | 6  | 6  | 5                         | 5  | 5  | 5,67           |
| 6   | Q8W4S4       | AT4G39080 | Vacuolar proton ATPase A3 (VHA-A3)                             | 466                           | 403  | 202  | 243                      | 290  | 215  | 649                     | 515  | 857  | 3840                 | 426,7            | 11                            | 10 | 11 | 5                          | 6  | 4  | 14                        | 12 | 15 | 9,78           |
| 7   | Q9LMM0       | AT1G01610 | Glycerol-3-phosphate sn-2-acyltransferase 4 (GPAT4)            | 549                           | 257  | 685  | 721                      | 317  | 279  | 292                     | 188  | 432  | 3720                 | 413,3            | 13                            | 8  | 13 | 17                         | 8  | 7  | 6                         | 4  | 12 | 9,78           |
| 8   | P61837       | AT3G61430 | Plasma membrane intrinsic protein 1a (PIP1a)                   | 490                           | 496  | 386  | 349                      | 379  | 310  | 408                     | 438  | 458  | 3714                 | 412,7            | 6                             | 6  | 6  | 6                          | 5  | 5  | 5                         | 5  | 5  | 5,44           |
| 9   | Q9SRH6       | AT3G01290 | Hypersensitive induced reaction 2 (HIR4)                       | 210                           | 387  | 199  | 330                      | 347  | 297  | 514                     | 459  | 465  | 3208                 | 356,4            | 5                             | 8  | 5  | 11                         | 9  | 7  | 12                        | 12 | 11 | 8,89           |
| 10  | Q501E6       | AT5G25250 | Flotillin 1 (FLOT1)  | 119                           | 133  | 84   | 231                      | 383  | 349  | 586                     | 503  | 610  | 2998                 | 333,1            | 4                             | 4  | 4  | 8                          | 7  | 7  | 13                        | 12 | 15 | 8,22           |
| 11  | Q39196       | AT4G00430 | Plasma membrane intrinsic protein 1;4 (PIP1;4)                 | 321                           | 471  | 284  | 232                      | 277  | 241  | 343                     | 370  | 403  | 2942                 | 326,9            | 5                             | 6  | 5  | 6                          | 5  | 5  | 6                         | 6  | 6  | 5,56           |
| 12  | F4JIM7       | AT4G21150 | Hapless 6 (HAP6)   | 426                           | 325  | 203  | 307                      | 394  | 157  | 384                     | 326  | 383  | 2905                 | 322,8            | 9                             | 9  | 9  | 9                          | 12 | 5  | 8                         | 6  | 11 | 8,67           |
| 13  | Q9XIE2       | AT1G59870 | Penetration 3 (PEN3)   | 306                           | 430  | 147  | 211                      | 350  | 147  | 363                     | 378  | 567  | 2899                 | 322,1            | 11                            | 15 | 11 | 7                          | 11 | 5  | 11                        | 11 | 17 | 11,00          |
| 14  | Q9LKR3       | AT5G28540 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a (BIP1) | 348                           | 448  | 56   | 233                      | 242  | 162  | 449                     | 193  | 527  | 2658                 | 295,3            | 9                             | 10 | 9  | 6                          | 7  | 5  | 12                        | 7  | 17 | 9,11           |
| 15  | Q08733       | AT1G01620 | Plasma membrane intrinsic protein 1c (PIP1c)                   | 351                           | 369  | 276  | 183                      | 282  | 257  | 244                     | 267  | 346  | 2575                 | 286,1            | 5                             | 5  | 5  | 4                          | 5  | 5  | 4                         | 5  | 5  | 4,78           |
| 16  | F4IVZ7       | AT2G39730 | Rubisco activase (RCA)   | 265                           | 204  | 116  | 279                      | 428  | 203  | 398                     | 310  | 359  | 2562                 | 284,7            | 5                             | 5  | 5  | 6                          | 8  | 5  | 9                         | 6  | 6  | 6,11           |
| 17  | P43286       | AT3G53420 | Plasma membrane intrinsic protein 2a (PIP2a)                   | 271                           | 383  | 322  | 241                      | 187  | 182  | 316                     | 290  | 364  | 2556                 | 284,0            | 6                             | 6  | 6  | 4                          | 6  | 3  | 6                         | 6  | 6  | 5,44           |
| 18  | Q944K2       | AT5G66680 | Defective glycosylation (DGL1)                                 | 324                           | 379  | 169  | 268                      | 260  | 248  | 258                     | 224  | 382  | 2512                 | 279,1            | 9                             | 9  | 9  | 8                          | 7  | 7  | 5                         | 6  | 9  | 7,67           |
| 19  | O03042       | ATCG00490 | Large subunit of RuBisCO (RBCL)                                | 408                           | 91   | 513  | 148                      | 240  | 425  | 226                     | 147  | 140  | 2338                 | 259,8            | 12                            | 2  | 12 | 5                          | 7  | 11 | 7                         | 4  | 5  | 7,22           |
| 20  | Q9CAR7       | AT1G69840 | Hypersensitive induced reaction 1 (ATHIR1)                     | 208                           | 342  | 225  | 122                      | 176  | 201  | 269                     | 261  | 229  | 2033                 | 225,9            | 5                             | 7  | 5  | 6                          | 5  | 5  | 9                         | 8  | 6  | 6,22           |
| 21  | P56778       | ATCG00280 | Photosystem II reaction center protein c (PSBc)                | 278                           | 516  | 192  | 116                      | 139  | 180  | 117                     | 98   | 235  | 1871                 | 207,9            | 5                             | 7  | 5  | 3                          | 5  | 4  | 2                         | 2  | 6  | 4,33           |
| 22  | Q8LAA6       | AT4G23400 | Plasma membrane intrinsic protein 1;5 (PIP1;5)                 | 235                           | 243  | 161  | 240                      | 193  | 115  | 192                     | 232  | 246  | 1857                 | 206,3            | 5                             | 4  | 5  | 5                          | 3  | 2  | 4                         | 4  | 5  | 4,11           |

**Tabla S4 (continuación)**

| No. | Unit<br>Id | AGI Id    | Proteína  | Puntuación<br>Mascot 6<br>semanas |     |     | Puntuación<br>Mascot 24 hpi |     |     | Puntuación<br>Mascot 72hpi |     |     | Puntuación<br>acumulada | Puntuación<br>media | Péptidos<br>detectados 6<br>semanas |    |    | Péptidos<br>detectados 24<br>hpi |    |    | Péptidos<br>detectados<br>72hpi |    |    | Media<br>péptidos |
|-----|------------|-----------|---|-----------------------------------|-----|-----|-----------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|----|----|----------------------------------|----|----|---------------------------------|----|----|-------------------|
|     |            |           |   | R1                                | R2  | R3  | R1                          | R2  | R3  | R1                         | R2  | R3  |                         |                     | R1                                  | R2 | R3 | R1                               | R2 | R3 | R1                              | R2 | R3 |                   |
| 23  | Q9C8G5     | AT1G30360 | Early-responsive to dehydration 4 (ERD4)                  | 263                               | 336 | 209 | 94                          | 96  | 58  | 128                        | 252 | 331 | 1767                    | 196,3               | 8                                   | 11 | 8  | 3                                | 4  | 2  | 3                               | 6  | 7  | 5,78              |
| 24  | Q9SVR1     | AT4G13160 | DUF593 (protein of unknown function/Zein-binding protein) | 379                               | 169 | 298 | 106                         | 111 | 76  | 159                        | 238 | 209 | 1745                    | 193,9               | 6                                   | 3  | 6  | 3                                | 3  | 2  | 4                               | 5  | 4  | 4,00              |
| 25  | P93004     | AT4G35100 | Plasma membrane intrinsic protein 3 (PIP3)                | 233                               | 166 | 132 | 288                         | 137 | 183 | 173                        | 102 | 219 | 1633                    | 181,4               | 3                                   | 3  | 3  | 3                                | 2  | 2  | 2                               | 2  | 3  | 2,56              |
| 26  | Q9STF2     | AT3G46780 | Plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)              | 318                               | 298 | 124 | 95                          | 129 | 79  | 158                        | 178 | 231 | 1610                    | 178,9               | 9                                   | 8  | 9  | 2                                | 4  | 2  | 5                               | 7  | 4  | 5,56              |
| 27  | P25856     | AT3G26650 | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase a subunit (GAPA) | 95                                | 174 | 107 | 56                          | 78  | 70  | 504                        | 139 | 335 | 1558                    | 173,1               | 2                                   | 5  | 2  | 2                                | 3  | 3  | 9                               | 5  | 8  | 4,33              |
| 28  | Q9SHC8     | AT2G45140 | Plant VAP homolog 12 (PVA12)                              | 196                               | 225 | 84  | 172                         | 148 | 127 | 183                        | 201 | 214 | 1550                    | 172,2               | 3                                   | 4  | 3  | 3                                | 3  | 4  | 4                               | 4  | 3  | 3,44              |
| 29  | P56757     | ATCG00120 | ATP synthase subunit alpha (ATPa)                         | 252                               | 189 | 90  | 104                         | 217 | 147 | 162                        | 151 | 165 | 1477                    | 164,1               | 9                                   | 8  | 9  | 3                                | 4  | 4  | 5                               | 4  | 4  | 5,56              |
| 30  | O04309     | AT3G16470 | Jasmonate responsive 1 (JR1)                              | 107                               | 129 | 74  | 158                         | 76  | 97  | 178                        | 247 | 275 | 1341                    | 149,0               | 3                                   | 2  | 3  | 4                                | 2  | 3  | 3                               | 5  | 4  | 3,22              |
| 31  | P31167     | AT3G08580 | ADP/ATP carrier 1 (AAC1)                                  | 101                               | 157 | 137 | 97                          | 188 | 82  | 214                        | 164 | 196 | 1336                    | 148,4               | 4                                   | 6  | 4  | 4                                | 7  | 2  | 8                               | 5  | 6  | 5,11              |
| 32  | Q8VZ95     | AT3G60600 | VAMP/synaptobrevin-associated protein 27-1 (VAP27-1)      | 90                                | 66  | 50  | 159                         | 154 | 117 | 109                        | 87  | 54  | 886                     | 98,4                | 3                                   | 2  | 3  | 6                                | 4  | 4  | 3                               | 3  | 2  | 3,33              |
| 33  | Q9SHE8     | AT1G31330 | Photosystem I subunit F (PSAF)                            | 86                                | 106 | 60  | 59                          | 129 | 102 | 50                         | 65  | 187 | 844                     | 93,8                | 3                                   | 3  | 3  | 2                                | 3  | 3  | 2                               | 2  | 4  | 2,78              |



**Tabla S5 Proteínas de LDs exclusivas de hojas de plantas senescentes**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados |    |    | Media péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|-------------------|-----|-----|----------------------|------------------|---------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                | R2  | R3  |                      |                  | R1                  | R2 | R3 |                |
| 1   | F4K873       | AT5G14740 | Carbonic anhydrase 2 (CA2)   | 257               | 222 | 231 | 710                  | 236,7            | 4                   | 5  | 5  | 4,67           |
| 2   | P56767       | ATCG00340 | Photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2 (PSAB)              | 303               | 220 | 186 | 709                  | 236,3            | 5                   | 4  | 6  | 5,00           |
| 3   | Q9S831       | AT4G28750 | PSA e1 knockout (PSAe-1)   | 176               | 158 | 146 | 480                  | 160,0            | 3                   | 3  | 2  | 2,67           |
| 4   | Q9S7J7       | AT2G05070 | Photosystem II light harvesting complex gene 2.2 (LHCB2.2)         | 105               | 158 | 212 | 475                  | 158,3            | 4                   | 4  | 4  | 4,00           |
| 5   | P27521       | AT3G47470 | Light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4 (LHCA4)  | 243               | 97  | 126 | 466                  | 155,3            | 5                   | 2  | 2  | 3,00           |
| 6   | Q9SUI4       | AT4G12800 | Photosystem I subunit L (PSAL)                                     | 125               | 153 | 83  | 361                  | 120,3            | 3                   | 2  | 2  | 2,33           |
| 7   | Q9SEL6       | AT5G39510 | Shoot gravitropism 4 (SGR4)  | 111               | 116 | 113 | 340                  | 113,3            | 2                   | 2  | 2  | 2,00           |
| 8   | Q9LTL0       | AT3G26290 | Cytochrome P450, family 71, subfamily b, polypeptide 26 (CYP71B26) | 107               | 126 | 71  | 304                  | 101,3            | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |
| 9   | Q9M2D8       | AT3G61260 | Remorin family protein   | 55                | 144 | 95  | 294                  | 98,0             | 2                   | 5  | 3  | 3,33           |
| 10  | P93014       | AT2G33800 | Scabra 1 (SCA1)  | 151               | 84  | 57  | 292                  | 97,3             | 4                   | 2  | 2  | 2,67           |
| 11  | Q42139       | AT4G32260 | Pigment defective 334 (PDE334)                                     | 79                | 157 | 55  | 291                  | 97,0             | 3                   | 4  | 2  | 3,00           |
| 12  | Q9LJG3       | AT3G14210 | Epithiospecifier modifier 1 (ESM1)                                 | 93                | 87  | 59  | 239                  | 79,7             | 2                   | 3  | 2  | 2,33           |

**Tabla S6. Proteínas exclusivas de LDs de hojas infectadas con *Pseudomonas***

| No.  | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot 24 hpi |     |     | Puntuación Mascot 72 hpi |     |     | Puntuación acumulada | Puntuación media | Péptidos detectados 24 hpi |    |    | Péptidos detectados 72 hpi |    |    | Media péptidos |
|--|--------------|-----------|--|--------------------------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|----------------------|------------------|----------------------------|----|----|----------------------------|----|----|----------------|
|  |              |           |  | R1                       | R2  | R3  | R1                       | R2  | R3  |                      |                  | R1                         | R2 | R3 | R1                         | R2 | R3 |                |
| Presentes en muestras de 24 y 72 hpi           |              |           |  |                          |     |     |                          |     |     |                      |                  |                            |    |    |                            |    |    |                |
| 1  | P20649       | AT2G18960 | H <sup>+</sup> -ATPase 1 (HA1)                                     | 244                      | 256 | 252 | 402                      | 245 | 421 | 1820                 | 303,3            | 7                          | 10 | 8  | 13                         | 8  | 14 | 10,00          |
| 2  | P92994       | AT2G30490 | Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)                                      | 232                      | 294 | 158 | 163                      | 114 | 156 | 1117                 | 186,2            | 7                          | 9  | 4  | 4                          | 3  | 4  | 5,17           |
| 3  | Q9SGH6       | AT3G01420 | α-Dioxigenasa (αDOX1)  | 217                      | 228 | 130 | 346                      | 173 | 583 | 1677                 | 279,5            | 6                          | 6  | 4  | 8                          | 6  | 14 | 7,33           |
| 4  | Q39085       | AT3G19820 | Dwarf 1 (DWF1)   | 120                      | 103 | 93  | 66                       | 69  | 141 | 592                  | 98,7             | 3                          | 3  | 3  | 2                          | 2  | 3  | 2,67           |
| 5  | Q9LW27       | AT3G26830 | Phytoalexin deficient 3 (PAD3)                                     | 126                      | 148 | 82  | 151                      | 123 | 66  | 696                  | 116,0            | 4                          | 6  | 3  | 6                          | 7  | 2  | 4,67           |
| 6  | Q9SVC2       | AT3G52400 | Syntaxin of plants 122 (SYP122)                                    | 79                       | 148 | 150 | 84                       | 160 | 106 | 727                  | 121,2            | 2                          | 3  | 3  | 2                          | 3  | 2  | 2,50           |
| 7  | P29402       | AT5G61790 | Calnexin 1 (CNX1)  | 130                      | 129 | 112 | 181                      | 115 | 180 | 847                  | 141,2            | 4                          | 3  | 5  | 3                          | 2  | 6  | 3,83           |
| Presentes exclusivamente en muestras de 24 hpi |              |           |  |                          |     |     |                          |     |     |                      |                  |                            |    |    |                            |    |    |                |
| 1  | Q5XF03       | AT4G00400 | Glycerol-3-phosphate sn-2-acyltransferase 8 (GPAT8)                | 505                      | 235 | 234 |                          |     |     | 974                  | 324,7            | 12                         | 5  | 6  |                            |    |    | 7,67           |
| 2  | Q9MA63       | AT3G05500 | LD-associated protein 3 (LDAP3)                                    | 230                      | 323 | 222 |                          |     |     | 775                  | 258,3            | 7                          | 8  | 5  |                            |    |    | 6,67           |
| 3  | Q9FJF1       | AT5G59840 | Ras-related small GTP-binding family protein                       | 208                      | 233 | 323 |                          |     |     | 764                  | 254,7            | 7                          | 5  | 5  |                            |    |    | 5,67           |
| 4  | Q70E96       | AT4G36250 | Aldehyde dehydrogenase 3F1 (ALDH3F1)                               | 319                      | 145 | 115 |                          |     |     | 579                  | 193,0            | 11                         | 3  | 3  |                            |    |    | 5,67           |
| 5  | Q9FPJ4       | AT5G47200 | Rab GTPase homolog 1a (RAB1a)                                      | 185                      | 121 | 197 |                          |     |     | 503                  | 167,7            | 5                          | 4  | 5  |                            |    |    | 4,67           |
| 6  | Q9LS94       | AT3G18820 | Rab GTPase homolog G3f (RAB7b)                                     | 100                      | 107 | 141 |                          |     |     | 348                  | 116,0            | 3                          | 3  | 5  |                            |    |    | 3,67           |
| 7  | F4I5X3       | AT1G10740 | α/β hydrolases superfamily proteins                                | 123                      | 95  | 96  |                          |     |     | 314                  | 104,7            | 4                          | 4  | 2  |                            |    |    | 3,33           |
| 8  | Q96283       | AT3G46830 | Rab GTPase homolog A2C (RABA2c)                                    | 90                       | 96  | 121 |                          |     |     | 307                  | 102,3            | 3                          | 3  | 4  |                            |    |    | 3,33           |
| 9  | O49342       | AT2G30770 | Cytochrome P450, family 71, subfamily a, polypeptide 13 (CYP71A13) | 171                      | 78  | 55  |                          |     |     | 304                  | 101,3            | 4                          | 4  | 2  |                            |    |    | 3,33           |
| 10   | Q9ZUA0       | AT2G01720 | Ribophorin I   | 77                       | 155 | 66  |                          |     |     | 298                  | 99,3             | 3                          | 5  | 2  |                            |    |    | 3,33           |
| 11   | Q9SE50       | AT1G52400 | Beta glucosidase 18 (BGLU18)                                       | 197                      | 53  | 45  |                          |     |     | 295                  | 98,3             | 6                          | 2  | 2  |                            |    |    | 3,33           |
| 12   | O23657       | AT1G43890 | Rab GTPase homolog B18 (RAB18)                                     | 49                       | 82  | 161 |                          |     |     | 292                  | 97,3             | 2                          | 2  | 4  |                            |    |    | 2,67           |
| 13   | O48832       | AT2G17840 | Early-responsive to dehydration 7 (ERD7)                           | 98                       | 113 | 75  |                          |     |     | 286                  | 95,3             | 2                          | 3  | 2  |                            |    |    | 2,33           |

**Tabla S6 (continuación)**

| No.  | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot 24 hpi |    |    | Puntuación Mascot 72 hpi |     |     | Puntuación acumulada | P media | Péptidos detectados 24 hpi |    |    | Péptidos detectados 72 hpi |    |    | Media Péptidos |
|--|--------------|-----------|--|--------------------------|----|----|--------------------------|-----|-----|----------------------|---------|----------------------------|----|----|----------------------------|----|----|----------------|
|  |              |           |  | R1                       | R2 | R3 | R1                       | R2  | R3  |                      |         | R1                         | R2 | R3 | R1                         | R2 | R3 |                |
| 14   | Q9M2U2       | AT3G55360 | Eceriferum 10 (CER10)  | 86                       | 91 | 54 |                          |     |     | 231                  | 77,0    | 2                          | 3  | 2  |                            |    |    | 2,33           |
| 15   | Q9SUR3       | AT4G23630 | VIRB2-interacting protein 1 (BT11)   | 60                       | 74 | 54 |                          |     |     | 188                  | 62,7    | 2                          | 4  | 2  |                            |    |    | 2,67           |
| 16   | Q8RWJ5       | AT1G29310 | Putative uncharacterized protein   | 57                       | 65 | 41 |                          |     |     | 163                  | 54,3    | 2                          | 2  | 2  |                            |    |    | 2,00           |
| Presentes exclusivamente en muestras de 72 hpi |              |           |  |                          |    |    |                          |     |     |                      |         |                            |    |    |                            |    |    |                |
| 1  | Q4V3D6       | AT5G25260 | Flotillin-like protein (FLOT1)   |                          |    |    | 434                      | 478 | 477 | 1389                 | 463,0   |                            |    |    | 11                         | 11 | 12 | 11,33          |
| 2  | Q9M9E1       | AT1G15520 | ATP-binding cassette G40 (ABCG40)  |                          |    |    | 458                      | 248 | 396 | 1102                 | 367,3   |                            |    |    | 11                         | 8  | 12 | 10,33          |
| 3  | F4JPJ7       | AT4G30190 | H <sup>+</sup> -ATPase 2 (HA2)   |                          |    |    | 365                      | 216 | 339 | 920                  | 306,7   |                            |    |    | 10                         | 7  | 11 | 9,33           |
| 4  | O80948       | AT2G39330 | Jacalin-related lectin 23 (JAL23)  |                          |    |    | 163                      | 366 | 341 | 870                  | 290,0   |                            |    |    | 4                          | 7  | 8  | 6,33           |
| 5  | F4J8V9       | AT3G18780 | Actin 2 (ACT2)   |                          |    |    | 270                      | 228 | 169 | 667                  | 222,3   |                            |    |    | 7                          | 5  | 5  | 5,67           |
| 6  | Q8RUC6       | AT2G35635 | Ubiquitin 7 (UBQ7)   |                          |    |    | 262                      | 89  | 194 | 545                  | 181,7   |                            |    |    | 3                          | 4  | 5  | 4,00           |
| 7  | Q9FNH6       | AT5G06320 | NDR1/HIN1-like 3 (NHL3)  |                          |    |    | 212                      | 184 | 122 | 518                  | 172,7   |                            |    |    | 4                          | 3  | 3  | 3,33           |
| 8  | O49340       | AT2G30750 | Cytochrome P450, family 71, subfamily a, polypeptide 12 (CYP71A12)   |                          |    |    | 195                      | 133 | 124 | 452                  | 150,7   |                            |    |    | 5                          | 3  | 4  | 4,00           |
| 9  | F4JXW9       | AT5G11560 | PQQ-DH domain containing protein   |                          |    |    | 94                       | 151 | 206 | 451                  | 150,3   |                            |    |    | 2                          | 4  | 5  | 3,67           |
| 10   | Q9SMX3       | AT5G15090 | Voltage dependent anion channel 3 (VDAC3)  |                          |    |    | 100                      | 73  | 260 | 433                  | 144,3   |                            |    |    | 3                          | 2  | 6  | 3,67           |
| 11   | F4KG21       | AT5G46110 | Acclimation of photosynthesis to environment 2 (APE2)  |                          |    |    | 151                      | 84  | 196 | 431                  | 143,7   |                            |    |    | 4                          | 3  | 4  | 3,67           |
| 12   | Q8GXS3       | AT4G25550 | Pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit 2   |                          |    |    | 97                       | 156 | 164 | 417                  | 139,0   |                            |    |    | 2                          | 3  | 2  | 2,33           |
| 13   | Q9FHM7       | AT5G51570 | SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family/Hypersensitive-induced response protein 4 |                          |    |    | 147                      | 70  | 198 | 415                  | 138,3   |                            |    |    | 4                          | 2  | 6  | 4,00           |
| 14   | Q02972       | AT4G37990 | Elicitor-activated gene 3-2 (ELI3-2)   |                          |    |    | 170                      | 90  | 140 | 400                  | 133,3   |                            |    |    | 3                          | 2  | 3  | 2,67           |
| 15   | F4HQT1       | AT1G13440 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 (GAPC2)  |                          |    |    | 203                      | 52  | 129 | 384                  | 128,0   |                            |    |    | 3                          | 2  | 4  | 3,00           |
| 16   | P43287       | AT2G37170 | Plasma membrane intrinsic protein 2 (PIP2b)  |                          |    |    | 111                      | 122 | 144 | 377                  | 125,7   |                            |    |    | 3                          | 4  | 5  | 4,00           |
| 17   | Q9SRH5       | AT3G01280 | Voltage dependent anion channel 1 (VDAC1)  |                          |    |    | 86                       | 100 | 166 | 352                  | 117,3   |                            |    |    | 2                          | 2  | 4  | 2,67           |
| 18   | P43297       | AT1G47128 | Responsive to dehydration 21A (RD21a)  |                          |    |    | 76                       | 72  | 195 | 343                  | 114,3   |                            |    |    | 3                          | 2  | 5  | 3,33           |
| 19   | Q9LS01       | AT3G25780 | Allene oxide cyclase 3 (AOC3)  |                          |    |    | 146                      | 111 | 81  | 338                  | 112,7   |                            |    |    | 3                          | 2  | 2  | 2,33           |

**Tabla S6 (continuación)**

| No. | Unit Prot Id | AGI Id    | Proteína   | Puntuación Mascot 24 hpi |    |    | Puntuación Mascot 72 hpi |     |     | Puntuación acumulada | P media | Péptidos detectados 24 hpi |    |    | Péptidos detectados 72 hpi |    |    | Media Péptidos |
|-----|--------------|-----------|--|--------------------------|----|----|--------------------------|-----|-----|----------------------|---------|----------------------------|----|----|----------------------------|----|----|----------------|
|     |              |           |  | R1                       | R2 | R3 | R1                       | R2  | R3  |                      |         | R1                         | R2 | R3 | R1                         | R2 | R3 |                |
| 20  | Q9ZV24       | AT2G28900 | Outer plastid envelope protein 16-1 (OEP16-1)                              |                          |    |    | 124                      | 123 | 89  | 336                  | 112,0   |                            |    |    | 3                          | 2  | 3  | 2,67           |
| 21  | Q9LI61       | AT3G30390 | Amino acid transporter AVT6A   |                          |    |    | 118                      | 102 | 93  | 313                  | 104,3   |                            |    |    | 2                          | 2  | 2  | 2,00           |
| 22  | Q9FMF7       | AT5G64290 | Dicarboxylate transport 2.1 (DIT2.1)                                       |                          |    |    | 97                       | 79  | 127 | 303                  | 101,0   |                            |    |    | 3                          | 2  | 3  | 2,67           |
| 23  | Q9SK50       | AT2G24820 | Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 55-II (TIC55-II) |                          |    |    | 67                       | 56  | 165 | 288                  | 96,0    |                            |    |    | 2                          | 2  | 8  | 4,00           |
| 24  | Q9SSR2       | AT1G52600 | Peptidase S24/S26A/S26B/S26C   |                          |    |    | 89                       | 80  | 73  | 242                  | 80,7    |                            |    |    | 2                          | 2  | 2  | 2,00           |
| 25  | Q9M2L4       | AT3G57330 | Autoinhibited Ca <sup>2+</sup> -ATPase 11 (ACA11)                          |                          |    |    | 48                       | 62  | 125 | 235                  | 78,3    |                            |    |    | 2                          | 2  | 3  | 2,33           |
| 26  | O65787       | AT2G24180 | Cytochrome P450 71B6 (CYP71B6)   |                          |    |    | 107                      | 78  | 48  | 233                  | 77,7    |                            |    |    | 4                          | 3  | 2  | 3,00           |
| 27  | Q9SAE4       | AT1G13100 | Cytochrome P450, family 71, subfamily b, polypeptide 29 (CYP71B29)         |                          |    |    | 63                       | 70  | 75  | 208                  | 69,3    |                            |    |    | 2                          | 2  | 2  | 2,00           |
| 28  | O81108       | AT4G37640 | Calcium ATPase 2 (ACA2)  |                          |    |    | 50                       | 55  | 55  | 160                  | 53,3    |                            |    |    | 2                          | 2  | 2  | 2,00           |